

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Biología Celular



TESIS DOCTORAL

**Dimorfismo sexual y efecto de las hormonas ováricas y
moduladores selectivos de los receptores de estrógeno en
modelos de trastornos afectivos y psicóticos en roedores**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Isabel María Calmarza Font

DIRECTOR:

Luis Miguel, dir García Segura

Madrid, 2015



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE



5329974625

T577.175
CAL
dim



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR

**DIMORFISMO SEXUAL Y EFECTO DE LAS
HORMONAS OVÁRICAS Y MODULADORES
SELECTIVOS DE LOS RECEPTORES DE
ESTRÓGENO EN MODELOS DE TRASTORNOS
AFECTIVOS Y PSICÓTICOS EN ROEDORES**

Memoria para optar al grado de Doctor en Neurociencia que presenta

Isabel María Calmarza Font

Realizada en el Instituto Cajal (CSIC) bajo la dirección

del Dr. Luis Miguel García-Segura

Vº Bueno del Director

Luis Miguel García-Segura

La interesada

Isabel María Calmarza Font

Madrid, 2011



40939443

627568234

Este trabajo ha sido realizado con cargo al proyecto del Ministerio de Educación y Ciencia SAF 2005-00272.

Isabel María Calmarza Font ha recibido financiación del Ministerio de Educación y Ciencia, dentro del programa de Formación de Personal Investigador (referencia de la beca: BES-2006-12252).

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero darle las gracias a mi director de tesis, Luis Miguel García-Segura, por confiar en mí y aceptarme en su laboratorio, y por estar siempre disponible para escucharme, aconsejarme, orientarme y sugerirme los pasos a seguir: tienes muchas más buenas cualidades, pero resalto esta porque como supervisor me parece esencial y no suele abundar... ¡me siento muy afortunada de haber trabajado contigo! Y gracias a Natalia Lagunas, amiga y compañera de alegrías y desdichas tanto científicas, como no científicas, ¡ha sido un lujo de los de verdad haberme encontrado contigo!

Gracias a todos los compañeros/as del laboratorio C-01, especialmente a Jole Bellini, María Santos, George Barreto y Amaya Sanz, por vuestra ayuda y por vuestro buen humor dentro y fuera del laboratorio: ¡esta aventura no habría sido tan divertida y fructífera sin vosotros! Muchas gracias a Iñigo Azcoitia, por su ayuda (incluso en circunstancias de lo más incómodas) y por dejarnos invadir el animalario de la Complutense y su laboratorio siempre que hizo falta. Y a Cristina García Cáceres y Julie Chowen por su dedicación, ayuda y simpatía el tiempo que trabajamos juntas. Gracias a las chicas del Animalario de Biológicas! Fueron las que más “sufrieron” de cerca nuestros experimentos eternos con “n” tendiendo a infinito...

Gracias especiales a Giamal Luheshi (mi “jefe” de Montreal) por aceptarme en su laboratorio y poner a mi disposición sus conocimientos y todos los medios para que mis experimentos llegaran a buen puerto, además de animarme cuando creía que las cosas no salían. Y a mis compañeros del Douglas Institute: Argel Aguilar, Julio Morales, Ke Cui, Gokce Somay, Suna Jung y Patrick Marcoux, que me ayudaron en todo lo que necesité, me sugirieron ideas increíblemente buenas y me hicieron sentir como en casa.

Y por último (pero no por ello son menos importantes), muchas gracias a todos mis amigos de fuera del laboratorio: Jose (shekh ma shieraki anni!), Bibi, Cristina, Araceli, Paloma, Ruth, Amaya (gracias a tu hospitalidad en Cabo de Gata empezó la inspiración!), Minuca, Carolina, Laura, Mauri, Alejo, Lorena, Jose MD (¡me salvaste la vida con la plantilla!) ... y muchísima más gente con la que he compartido mi vida estos años...Gracias por estar a mi lado y escucharme las batallitas científicas, las quejas, los discursos frikis, las especulaciones varias... ¡vosotros sí que sois un antídoto contra el estrés!

Dedicado a mi madre Isabel y a mi padre Jose Luis

Índice

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| ABREVIATURAS | 3 |
| RESUMEN | 5 |
| INTRODUCCIÓN..... | 7 |
| OBJETIVOS | 23 |
| MATERIALES Y MÉTODOS..... | 27 |
| 1. Diseño experimental..... | 29 |
| 1.1. Estrés crónico y privación hormonal. | 29 |
| 1.2. LPS prenatal..... | 32 |
| 2. Protocolos y reactivos. | 36 |
| 2.1. Conducta | 36 |
| 2.2. Cirugía, sacrificio y toma de muestras. | 40 |
| 2.3. Inmunohistoquímica. | 41 |
| 2.4. Bioquímica (Western blot) | 43 |
| 2.5. ELISAs. | 48 |
| 2.6. Análisis estadístico. | 49 |
| RESULTADOS | 51 |
| 1. Estrés crónico y privación hormonal..... | 53 |
| 1.1. Efecto del estrés crónico y la privación hormonal sobre conducta depresiva y de ansiedad. | 53 |
| 1.2. Efecto del estrés crónico y la privación hormonal sobre la conducta anhedónica. . | 57 |
| 1.3. Efecto del estrés crónico y la privación hormonal en las células de glía. | 58 |
| 1.4. Efecto del estrés crónico y la privación hormonal en la proliferación celular en el giro dentado del hipocampo. | 61 |
| 1.5. Efecto de las hormonas ováricas y los SERMs sobre las conductas asociadas a ansiedad y depresión causadas por el estrés crónico y la privación hormonal..... | 62 |
| 2. LPS prenatal | 65 |
| 2.1. Efecto del LPS prenatal sobre la señalización por IGF-1 y los receptores de estrógeno..... | 65 |
| 2.2. Efecto del LPS prenatal, dimorfismo sexual y privación hormonal en el reconocimiento de objetos. | 71 |
| 2.3. Efecto de las hormonas ováricas y los SERMs en el reconocimiento de objetos.... | 76 |
| 2.4. Inhibición Prepulso: efecto del LPS prenatal, dimorfismo sexual y acción del estradiol | 78 |
| 2.5. Hiperlocomoción inducida por anfetamina, efecto del LPS prenatal, dimorfismo sexual y acción del estradiol..... | 81 |
| 2.6. Actividad dopaminérgica: efecto del LPS, dimorfismo sexual y acción del estradiol | 86 |

Índice

| | |
|--|-----|
| 2.7. Marcadores de inflamación sistémicos (IL-1ra y TNF α) y en cerebro (COX-2), efecto del LPS, dimorfismo sexual y acción del estradiol..... | 89 |
| DISCUSIÓN..... | 95 |
| 1. Efectos del estrés crónico y la privación de hormonas ováricas sobre la conducta depresiva, de ansiedad y anhedonia..... | 97 |
| 2. Efectos del estrés crónico y la privación de hormonas ováricas en las células de glía y la proliferación celular en el giro dentado | 101 |
| 3. Efecto de las hormonas ováricas y los SERMs sobre las conductas asociadas a ansiedad y depresión causadas por el estrés crónico y la privación de hormonas ováricas | 105 |
| 4. Influencia del LPS prenatal sobre la señalización por IGF-1 y los receptores de estrógenos | 107 |
| 5. Efecto del LPS prenatal, el género, la privación de hormonas gonadales y el tratamiento con estradiol, progesterona, tamoxifeno o raloxifeno en el reconocimiento de objetos..... | 112 |
| 6. Efecto del LPS prenatal, el género, el estradiol y la privación de hormonas gonadales ováricas en la inhibición prepulso | 119 |
| 7. Efecto del LPS prenatal, el género, el estradiol y la privación de hormonas gonadales ováricas sobre respuesta a anfetamina y actividad dopaminérgica | 121 |
| 8. Efecto del LPS prenatal, el género, el estradiol y la privación de hormonas gonadales ováricas sobre marcadores de inflamación..... | 128 |
| CONCLUSIONES..... | 137 |
| BIBLIOGRAFÍA | 141 |

ABREVIATURAS

Akt: proteína quinasa B

BDNF: factor neurotrófico derivado de cerebro

BrdU: 5-bromo-2'-deoxiuridina

COX-2: ciclooxigenasa 2

E2: 17 β -Estradiol

EC: estrés crónico

ERK 1/2: quinasas reguladas por señales extracelulares tipo 1 y 2

ER α : receptor de estrógenos alfa

ER β : receptor de estrógenos beta

GFAP: proteína ácida fibrilar de glía

GSK-3: glucógeno sintasa quinasa 3

HIA: Hiperlocomoción inducida por anfetamina

IBA-1: proteína adaptadora de unión a ión calcio

IGF-1: factor de crecimiento similar a insulina tipo 1

IGF-1R: receptor de IGF-1

IL-1: interleuquina 1

IL-1ra: antagonista del receptor de interleuquina 1

IL-6: interleuquina 6

IP: Inhibición Prepulso

LCE: Laberinto en cruz elevado

LPS: Lipopolisacárido de *E. Coli*

NF: Natación forzada

NG2: proteoglicano condroitin sulfato

Okx: orquidectomía

Abreviaturas

Ovx: ovariectomía

P4: Progesterona

P-AKT: proteína quinasa B fosforilada

P-ERK 1/2: ERK tipo 1 y 2 fosforiladas

P-GSK3: glucógeno sintasa quinasa fosforilada

R: raloxifeno

RO: Reconocimiento de objetos

SERM: regulador selectivo de los receptores de estrógeno

T: tamoxifeno

TH: tirosina hidroxilasa

TNF α : factor de necrosis tumoral alfa

RESUMEN

El 17 β -estradiol (estradiol) y la progesterona son las principales hormonas sexuales femeninas. Aunque su papel más conocido es en desarrollo, diferenciación sexual y reproducción, ambas tienen importantes efectos en el sistema nervioso. Ambas hormonas muestran propiedades neuroprotectoras y antiinflamatorias que limitan los daños producidos por distintos agentes y facilitan la recuperación. Sumado a esto, existen numerosos indicios de que en diversas patologías en humanos, y en algunos de los modelos animales de estas, existe un dimorfismo sexual y las hormonas ováricas podrían ejercer un efecto protector y/o terapéutico. Asimismo, los moduladores selectivos de los receptores de estrógeno también presentan actividad neuroprotectora similar a la del estradiol, con la ventaja de ejercer un efecto antagonista en varios tejidos periféricos.

En esta tesis se ha investigado el efecto de la privación de hormonas ováricas y del tratamiento con estradiol, progesterona y los moduladores selectivos de los receptores de estrógeno en dos modelos de patologías psiquiátricas: la depresión y la esquizofrenia. En el modelo de depresión, se determinó la influencia del estrés y la ovariectomía en ratones hembra en comportamientos que modelizan la depresión y la ansiedad en humanos. Se estudiaron también los efectos del estrés y la ovariectomía sobre la proliferación celular en el hipocampo, que ha sido relacionada con la depresión y sobre las células de glía, que son las primeras que acusan cualquier agresión al sistema nervioso debido a su rol inmunológico. Descubrimos que la interacción entre el estrés y la ovariectomía, especialmente la ovariectomía de larga duración, hacen emerger comportamientos de tipo depresivo y ansioso, y la ovariectomía por sí sola induce un aumento en la densidad de astrocitos y células NG2 y una disminución en la proliferación celular. Además, el tratamiento con estradiol, progesterona, raloxifeno o tamoxifeno es capaz de revertir los efectos conductuales observados.

En el segundo modelo de estudio, estudiamos ratas macho y hembra sometidas a inyección de LPS prenatal, como modelo de esquizofrenia. Observamos que las ratas macho mostraron un mayor deterioro que las ratas hembra en diversas pruebas conductuales relevantes para la esquizofrenia. En el test de reconocimiento de objetos las ratas macho tratadas prenatalmente con LPS mostraron un deterioro que no se observó en

Resumen

las hembras y además también se observaron alteraciones en los receptores de estrógeno y componentes de las vías de señalización por IGF-1 de la fosfoinositol 3-quinasa (PI3K) y de las proteínas quinasa activadas por mitógeno (MPAK), que están implicadas en los mecanismos de neuroprotección por estradiol. El tratamiento con estradiol, progesterona, tamoxifeno y raloxifeno revirtió los déficits observados en ratas macho en el reconocimiento de objetos.

También se observó una alteración leve en la inhibición prepulso en machos, pero no en hembras, y una falta de respuesta a anfetamina en machos que tampoco se observó en hembras intactas, aunque la privación hormonal en hembras indujo también un defecto en la respuesta dopaminérgica. Estos efectos, fueron acompañados, tanto en ratas macho como en hembra, por alteraciones en la expresión de marcadores de actividad dopaminérgica y de inflamación. Estas alteraciones fueron más frecuentes en ratas macho y de distinta índole que en las hembras, demostrando así de nuevo la distinta susceptibilidad a insultos inflamatorios y distinta respuesta a hormonas que existe en machos y hembras. El tratamiento con estradiol normalizó la inhibición prepulso y la respuesta a anfetamina en ratas macho tratadas prenatalmente con LPS. Asimismo el estradiol demostró modular los marcadores de actividad dopaminérgica e inflamación de una forma diferente en machos y hembras, y en algunos casos los animales LPS mostraron una respuesta diferente al estradiol que los controles.



INTRODUCCIÓN

EL ESTRADIOL Y LA PROGESTERONA

Síntesis y origen

El 17 β -estradiol (que a partir de ahora llamaremos estradiol) y la progesterona son las principales hormonas sexuales femeninas. La síntesis del estradiol, la progesterona y varios de sus metabolitos se realiza a partir del colesterol, a través de una ruta biosintética que también puede resultar en la producción de testosterona (figura 1).

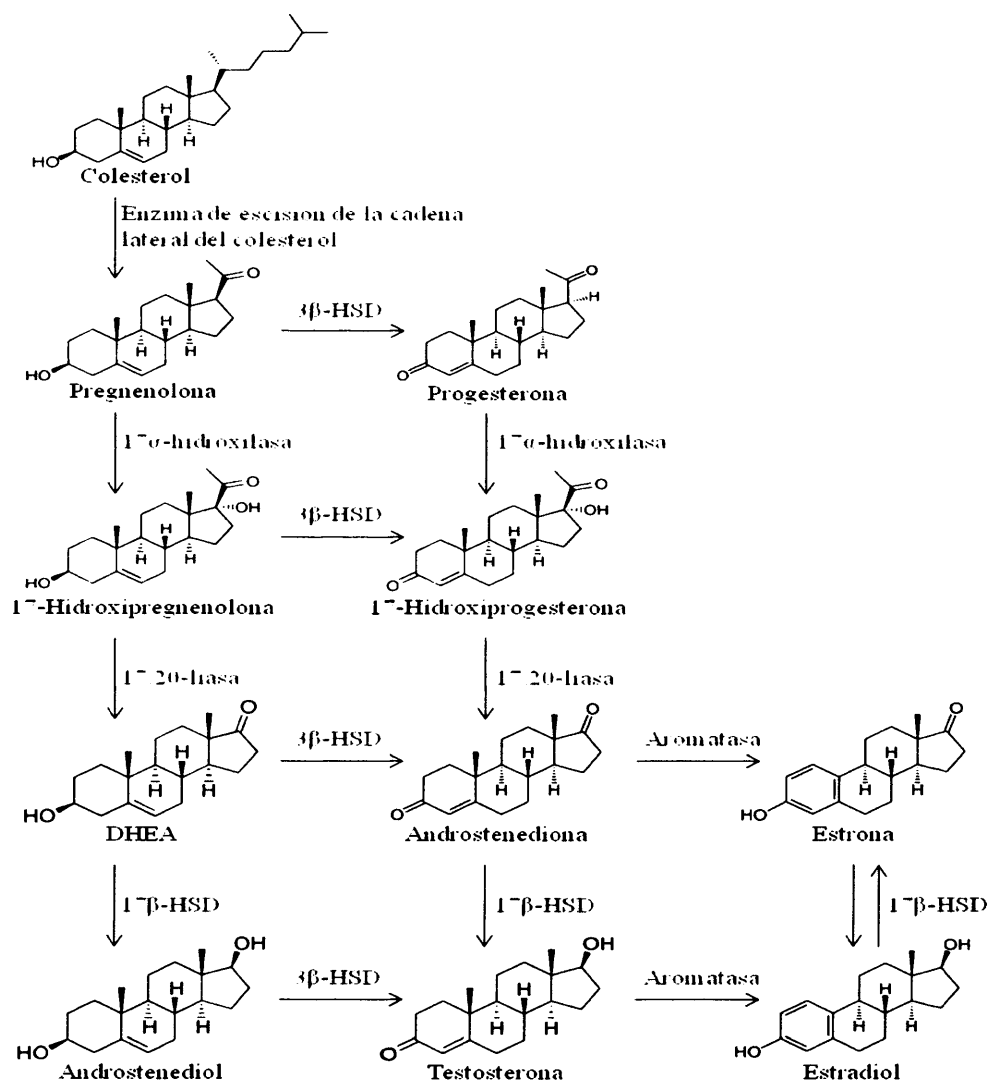


Figura 1: Biosíntesis de las hormonas sexuales y sus metabolitos 3 β -HSD: 3- β -hidroxi-esteroide-deshidrogenasa; 17 β -HSD: 17 β -hidroxi-esteroide-deshidrogenasa; DHEA: dehidroepiandrosterona.

La principal fuente del estradiol y la progesterona en mujeres en edad reproductiva es el ovario, pero el estradiol también puede ser sintetizado por los testículos en los hombres y por la corteza suprarrenal, el tejido adiposo y el cerebro en ambos sexos. La progesterona también se sintetiza en las glándulas suprarrenales, en cerebro y durante el embarazo en la placenta. Durante el desarrollo prenatal, los fetos masculinos están expuestos a testosterona de procedencia testicular que tras su aromatización a estradiol en el tejido nervioso induce varios eventos como la síntesis de prostaglandinas que conducirán a la masculinización del cerebro (Wright y cols., 2010). Durante el desarrollo postnatal y la pubertad, el estradiol adquiere vital importancia para el desarrollo del comportamiento sexual femenino, las características sexuales secundarias y el control de los ciclos reproductivos (McCarthy y cols., 2009). El estradiol y la progesterona funcionan de forma coordinada para inducir la ovulación: previamente a esta se da una elevación en los niveles de estradiol y progesterona de procedencia ovárica. El incremento en los niveles plasmáticos de estradiol induce la síntesis de receptores de progesterona en el hipotálamo. Además, recientemente se ha observado que el aumento de estradiol de origen ovárico también induce la síntesis de progesterona en el hipotálamo (Micevych y Sinchak, 2008).

El estradiol y la progesterona no están solamente implicados en el control de la reproducción, sino que también regulan numerosas funciones biológicas en tejidos no reproductivos como el sistema cardiovascular, el hueso y el sistema nervioso (Scarpin y cols., 2009).

Mecanismos de acción

Tanto el estradiol como la progesterona pueden actuar a través de mecanismos iniciados en la membrana celular y a través de mecanismos que dependen de receptores intracelulares. Los receptores mejor caracterizados que median la acción del estradiol, son los receptores de estrógenos α (ER α) y β (ER β), que son codificados por distintos genes y forman parte de la super familia de receptores nucleares (Green y cols., 1986; Kuiper y cols., 1996). Ambas isoformas poseen un dominio N-terminal responsable de la función trans-activadora (AF-1), el dominio C, responsable de la unión a ADN, un dominio bisagra con la señal de translocación al núcleo y el dominio E/F, donde se produce la unión de ligando y se encuentra la función reguladora de activación de la transcripción (Micevych y Dominguez, 2009). El ER α y el ER β presentan diferencias entre sí en sus dominios AF1 y

AF2, lo cual podría ser una de las formas por la que regulan distintos eventos (Gonzales y cols., 2008; Tee y cols., 2004).

Tras la unión del estradiol, los receptores dimerizan pudiendo formar homodímeros y heterodímeros y se asocian a unas zonas específicas de los promotores en el DNA, los elementos de respuesta a estrógeno (ERE) donde atraen maquinaria transcripcional y cofactores para regular la expresión génica (Cheskis y cols., 2007). El estradiol también puede modular genes que carecen de las secuencias ERE mediante la interacción de los ER con factores de transcripción como el NF κ B, CREB o fos/jun regulando la transcripción a través de la proteína activadora 1 (AP-1) (Morissette y cols., 2008a).

Además de la regulación génica directa, también existen ER α y ER β asociados a membrana, junto a otros receptores que unen estradiol como el ER-X y el GPR30 (Hazell y cols., 2009; Toran-Allerand y cols., 2002). Estos receptores asociados a membrana desencadenan acciones rápidas que finalmente también pueden regular la transcripción (Bjornstrom y Sjoberg, 2005). Por este tipo de mecanismos, el estradiol regula las vías de las proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPK) y de la fosfatidilinositol-3 quinasa (PI3K)/Akt (Dhandapani y Brann, 2002). A través de la activación de los receptores de estrógeno, el estradiol conduce a una activación secuencial de proteínas que termina con la activación de las quinasas ERK1 y 2, que a su vez activan numerosos factores de transcripción relacionados con supervivencia neuronal (Marin y cols., 2005; Mhyre y Dorsa, 2006). A su vez, el estradiol induce la activación de la Akt (Chong y cols., 2005) que regula una gran cantidad de proteínas relacionadas con supervivencia y apoptosis como Bcl-2, Bcl-X, Bax y Bad (Mattson, 2000; Garcia-Segura y cols., 2001). Ambas vías convergen en la inhibición por fosforilación en la serina 9 de la glicógeno sintasa quinasa-3 β (GSK-3), promoviendo dicha inhibición la supervivencia neuronal (Hetman y cols., 2000). El estradiol modula estas vías de una forma cooperativa con el factor de crecimiento similar a insulina 1 o IGF-1 (Chong y cols., 2005; Cardona-Gómez y cols., 2001), como se puede observar en la figura 2. A través de la interacción entre sus receptores el estradiol y el IGF-1, ejercen numerosas acciones neuroprotectoras y regulan el desarrollo neuronal, la plasticidad sináptica y la neurogénesis postnatal (revisado por García-Segura y cols., 2010).

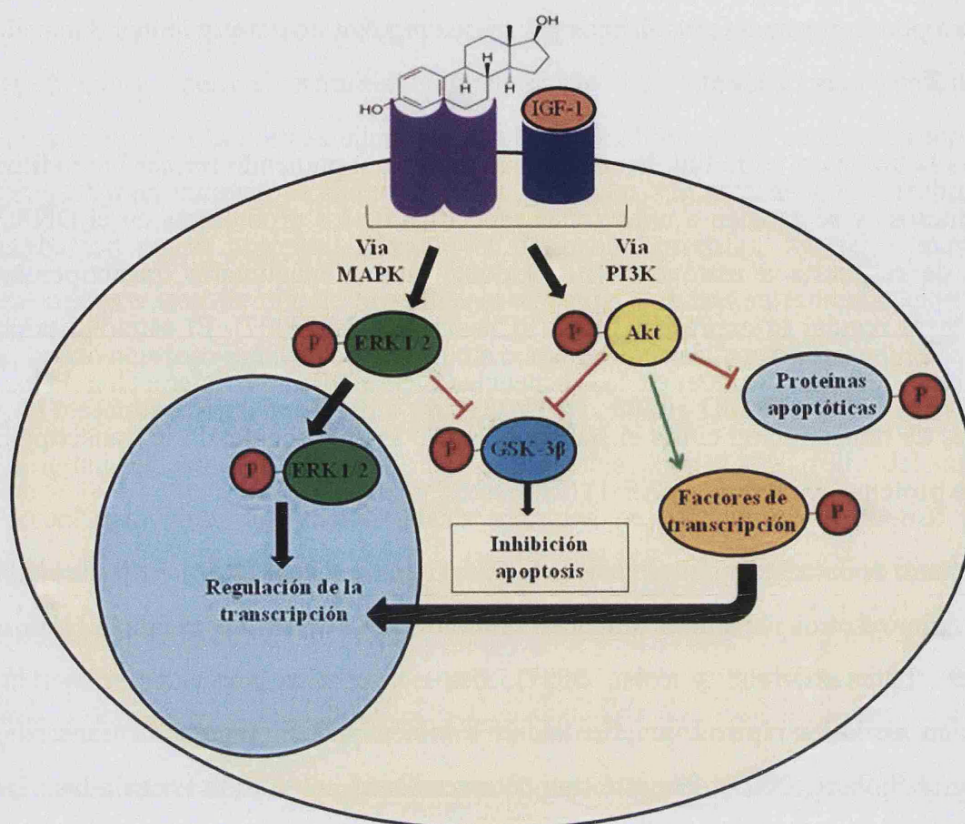


Figura 2: mecanismos de neuroprotección por estradiol e IGF-1. El estradiol y el IGF-1 activan las vías de PI3K y MAPK. Esto conduce a la fosforilación de ERK y su translocación al núcleo donde puede regular la transcripción. Por otro lado, Akt activada fosforila varias proteínas inhibiéndolas o activándolas, y a factores de transcripción lo que lleva a su translocación al núcleo donde regularán la transcripción. Ambas vías inducen la inhibición de GSK-3 por fosforilación lo cual induce supervivencia neuronal.

La progesterona, al igual que el estradiol, también puede actuar por medio de mecanismos iniciados en la membrana o mediados por receptores intracelulares. El receptor de progesterona (PR) constituye un ejemplo de los receptores de la transcripción activados por ligando. Este receptor consta de un dominio C terminal de unión a ligando y múltiples elementos activadores o inhibidores que al asociarse con correguladores transcripcionales inducen o inhiben la expresión de genes diana (revisado por Scarpin y cols., 2009). El mecanismo de acción es similar al del estradiol, ya que tras la unión con el ligando los receptores dimerizan y se translocan al núcleo donde se unen a regiones del DNA con elementos de respuesta progestinas en los promotores de los genes diana (Beato y cols., 1987; Tata y cols., 2002).

El mismo PR puede activar de forma directa cascadas de segundos mensajeros activando vías como de la de las MAPK (Lange y cols., 1998; Leonhardt y cols., 2003). Al igual que el estradiol, este efecto se realiza mediante una acción conjunta con receptores de factores de crecimiento (Lange, 2008) y promueve la neuroprotección por progesterona (Nilsen and Brinton, 2003a). Asimismo, también los metabolitos de la progesterona cuentan con efectos neuroprotectores (Ciriza y cols., 2006). El primer receptor de progesterona de membrana identificado fue el 25-Dx en 1996, mostrando principalmente especificidad por la unión con progesterona, aunque también puede unir testosterona, pero no estradiol (Falkenstein y cols., 1996; 1999). Se ha sugerido que podría regular directamente la vía de Jak/STAT y en ovario interacciona con la proteína de membrana PAIRBP1 (proteína de unión a mRNA inhibidora del activador de plasminógeno) formando un complejo con actividad antiapoptótica (Peluso y cols., 2006). En cerebro de rata se ha demostrado que el receptor 25-Dx se expresa en numerosas estructuras como hipotálamo, cerebelo, corteza tanto en machos como en hembras y en modelos de lesión de médula espinal aumenta su expresión ejerciendo acciones importantes para la recuperación, lo cual sugiere que este receptor podría estar implicado en los efectos neuroprotectores de la progesterona, (Guenoun y cols., 2008). También se ha descubierto recientemente otro receptor de progesterona localizado en la membrana que no guarda relación con el receptor de progesterona clásico. Este receptor se localizó inicialmente en peces, pero posteriormente también ha sido identificado en tejido de mamíferos (Dressing y cols., 2001).

NEUROPROTECCIÓN POR ESTRADIOL

El estradiol muestra efectos neuroprotectores en numerosos modelos *in vivo* e *in vitro*. En cultivos celulares, el estradiol promueve la supervivencia, proliferación y diferenciación de neuronas de hipotálamo, amígdala, corteza e hipocampo (Amantea y cols., 2005). También se ha descrito que previene la muerte de neuronas corticales expuestas a glutamato (Singer y cols., 1996; Sribnick y cols., 2004), AMPA (Zaulyanov y cols., 1999), azida sódica, kainato o NMDA (Regan y Guyo, 1997) y se ha observado que a concentraciones fisiológicas previene la toxicidad inducida por la proteína β -amiloide. (Goodman y cols., 1996; Guerra y cols., 2004).

En modelos animales, el estradiol reduce el daño cerebral causado por isquemia en ratas y reduce el daño hipocampal cuando este es administrado previamente a la isquemia cerebral (Wang y cols., 1999; Bagetta y cols., 2004). También en modelos de Parkinson, en los que se inducen lesiones nigroestriatales por inyección de MPTP, se ha observado que el estradiol previene la reducción de dopamina estriatal en ratones macho y hembras ovariectomizadas (Dluzen y cols., 1996; Callier y cols., 2000; Ramirez y cols., 2003). En modelos de excitotoxicidad inducida por kainato, el estradiol ha demostrado prevenir la pérdida neuronal en el hilus del giro dentado del hipocampo (Azcoitia y cols., 1998; Picazo y cols., 2003) y también ha demostrado minimizar los efectos neurotóxicos inducidos por la gp120, una proteína de la envoltura del virus HIV-1 (Corasaniti y cols., 2005). Por tanto, el estradiol tiene la capacidad de prevenir o disminuir la muerte neuronal ante una gran variedad de daños neurodegenerativos.

Muchas de las acciones protectoras del estradiol, dependen de su efecto antiinflamatorio. La neuroprotección que ejerce en modelos de isquemia cerebral y esclerosis múltiple, entre otros, depende de su capacidad de regular negativamente el factor de necrosis tumoral α (TNF α), además de la expresión de varias citoquinas proinflamatorias y sus receptores (Liao y cols., 2002; Ito y cols., 2001; Matejuk y cols., 2001). Asimismo, en modelos de inflamación inducida por el lipopolisacárido de E.Coli (LPS) y por lesión penetrante del hipocampo, el estradiol posee la capacidad de reducir la reactividad glial (Tapia-Gonzalez y cols., 2008; Barreto y cols., 2009). El efecto antiinflamatorio del estradiol parece depender de la activación de la vía de las MAPK en células de microglía e implica la inhibición de varios factores proinflamatorios como iNOS, PGE2 y MMP-9 (Bruce-Keller y cols., 2000; Vegeto y cols., 2001) e inhibe la activación del NF κ B (Wen y cols., 2004).

Otro mecanismo por el que el estradiol ejerce neuroprotección es mediante su capacidad de prevenir el daño por estrés oxidativo (Nilsen, 2008). El estrés oxidativo contribuye a los efectos degenerativos de varias patologías como el cáncer, enfermedades cardiovasculares y disfunción cerebral y también está presente en enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer (Ames y cols., 1993; Butterfield y Lauderback, 2002). La propia molécula de estradiol es antioxidante, gracias a su grupo hidroxilo en el carbono 3 (Behl y cols., 1997), pero no está claro si puede ejercer neuroprotección de esta manera, ya que este efecto antioxidante directo requiere concentraciones suprafisiológicas

de 1-10 μ M (Behl y cols., 1995; Mukai y cols., 1990; Keller y cols., 1997; Nakano y cols., 1987). Es posible que la protección antioxidativa del estradiol se ejerza a través de su capacidad de modular enzimas con actividad antioxidante como la dismutasa, la catalasa y la glutatión peroxidasa (Murakoshi y cols., 1999; Azevedo y cols., 2001). El estradiol previene el daño mitocondrial producido por especies oxidantes por dos mecanismos: en primer lugar incrementa los niveles de glutatión y la expresión de las enzimas glutatión peroxidasa y manganeso superóxido dismutasa (Borras y cols., 2003). En segundo lugar, el estradiol atenúa los desequilibrios en los niveles de calcio inducidos por la excitotoxicidad por glutamato, que es uno de los mecanismos inductores de daños neurológicos asociados a un aumento de estrés oxidativo (Greenamyre y Young, 1989; Beal, 1992; Brorson y cols., 1995; Nilsen y Brinton, 2003b). La capacidad de disminuir el daño por estrés oxidativo del estradiol no es independiente de su capacidad antiinflamatoria, ya que eventos inflamatorios de diverso tipo inducen también un aumento en la generación de especies reactivas de oxígeno, aumentando así el estrés oxidativo (Lonkar y Dedon, 2011; Baliya y Lowry, 2011; Naik y Dixit, 2011; Galimberti y Scarpini, 2011).

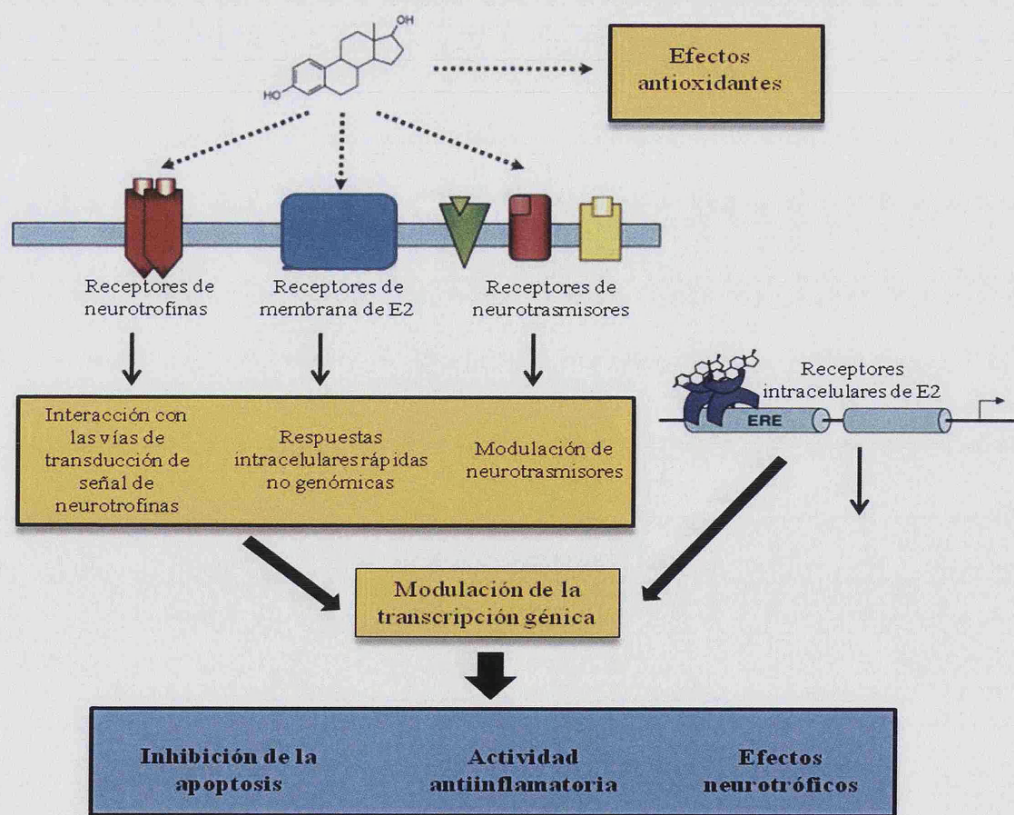


Figura 3: esquema de los mecanismos de neuroprotección por estradiol. Adaptación de Amantea y cols., 2005.

Por último, el estradiol es capaz de modular la actividad de los principales neurotransmisores como acetilcolina, dopamina, norepinefrina, serotonina, glutamato y GABA (Etgen y García-Segura, 2009). De esta forma, la hormona es capaz de disminuir los daños producidos por patologías que causan desequilibrios en la actividad o los niveles de neurotransmisores, como es el caso del Parkinson en que se produce un deterioro de la neurotransmisión dopaminérgica (Saunders-Pullman y cols., 1999; Saunders-Pullman, 2003; Liu y Dluzen, 2007). De esta forma, mediante la coordinación de varios mecanismos, el estradiol tiene la capacidad de atenuar daños en el sistema nervioso inducidos por diversas patologías (figura 3).

EFFECTOS DE LAS HORMONAS OVÁRICAS Y DIMORFISMO SEXUAL EN PATOLOGÍAS PSIQUIÁTRICAS Y NEURODEGENERATIVAS

Tanto en humanos como en modelos animales, se han observado importantes diferencias sexuales en la incidencia de depresión, trastornos de ansiedad, esquizofrenia, enfermedad de Parkinson y enfermedad de Alzheimer, entre otras patologías del sistema nervioso. En enfermedades con un claro componente inflamatorio, como es el caso de la enfermedad de Parkinson o la esclerosis lateral amiotrófica se observa una mayor incidencia en hombres, que en mujeres, y generalmente en mujeres se da un aumento de casos tras la menopausia, sugiriendo que el descenso en las hormonas ováricas está actuando como un factor de riesgo (Pozzi y cols., 2006). La utilización de terapia hormonal en mujeres durante el periodo perimenopáusico ha demostrado mantener su capacidad cognitiva y ralentizar el progreso de la enfermedad de Alzheimer (Henderson y cols., 1994; Henderson, 1997). En ratones transgénicos para APP23, un modelo de enfermedad de Alzheimer, la delección del gen de la aromatasa causa un incremento en los síntomas de la enfermedad y una mayor acumulación de proteína β -amiloide, confirmando el efecto perjudicial de la falta de estrógenos en esta patología. (Yue y cols., 2005).

La enfermedad de Parkinson se caracteriza por una progresiva degeneración de las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales que lleva a la aparición de síntomas motores y otras alteraciones como dificultad para conciliar el sueño, depresión y ansiedad (Heisters, 2011). La frecuencia de la enfermedad de Parkinson es mayor en hombres, teniendo un ratio de 1:5 comparado con las mujeres (Rajput y cols., 1984). Además, las mujeres

muestran menor gravedad en los síntomas, requieren menos dosis de tratamiento por levodopa y suelen mostrar un empeoramiento cuando experimentan una disminución en los niveles de estradiol durante el ciclo menstrual (Lyons y cols., 1998; Quinn y Marsden, 1986). En modelos animales también se han observado diferencias sexuales en el sistema nigroestriado. En primates se ha detectado que las hembras presentan mayor densidad de células dopaminérgicas que los machos, y una vez ovariectomizadas sufren una pérdida de estas que a su vez es prevenida si son tratadas con estradiol (Leranth y cols., 2000). En roedores los machos son más sensibles a la inducción de neurodegeneración dopaminérgica, y además las hembras responden de distinta manera al tratamiento con estradiol que los machos (Kipp y cols., 2006; Bourque y cols., 2009). El tratamiento con estradiol reduce los daños causados por MPTP y metanfetamina en ratones (Bourque y cols., 2009) tanto en ratones macho como en hembras. La progesterona ha sido menos estudiada que el estradiol en esta enfermedad, pero también podría contribuir a la protección que parecen presentar las mujeres frente a los hombres, puesto que en ratones se han descrito efectos protectores de la progesterona en neuronas dopaminérgicas expuestas a toxicidad por MPTP y glutamato (Nilsen y Brinton, 2003b; Grandbois y cols., 2000).

En trastornos de ansiedad y depresión mayor también se observa un claro dimorfismo sexual. En este caso las mujeres están afectadas en mayor medida que los hombres, siendo la depresión mayor casi dos veces más frecuente en mujeres que en hombres y la prevalencia de los trastornos de ansiedad es de un 30.5% en mujeres frente a un 19.2% en hombres (Weissman y cols., 1993; Kessler y cols., 1994). Se ha demostrado una relación entre el descenso de hormonas gonadales y este tipo de patologías, ya que se suele dar un aumento de casos o empeoramiento de síntomas en situaciones en que se da una disminución en los niveles de hormonas ováricas como la perimenopausia, durante el periodo premenstrual o tras el parto (Schmidt y cols., 2004, Žukov y cols., 2010; Hendrick y cols., 1998). En mujeres postmenopáusicas, algunos estudios han reportado mejoras en el estado de ánimo cuando reciben terapia hormonal (Hlatky y cols., 2002).

Tanto la progesterona, como el estradiol han demostrado ejercer efectos antidepresivos y ansiolíticos en modelos de depresión y ansiedad en roedores (Walf y Frye, 2005; 2010; Frye y cols., 2006; Frye y Walf, 2009). Entre los mecanismos implicados, posiblemente se encuentren la capacidad de modulación del sistema serotoninérgico por el

estradiol, y la regulación de la actividad GABAérgica por parte de la progesterona (Etgen y García-Segura, 2009; Bitran y cols., 1993; Maguire y Mody, 2005). Otro posible modo de acción del estradiol es a través de su acción antiinflamatoria, puesto que se ha descrito que la expresión de síntomas depresivos está mediada por una mayor actividad de citoquinas proinflamatorias (Goshen y cols., 2007; Chourbaji y cols., 2006).

La esquizofrenia es una patología cuyos síntomas suelen hacerse evidentes tras la pubertad. Aunque la incidencia es similar para hombre y mujeres, en mujeres se suele presentar varios años después que en los hombres, y hay un segundo pico de aparición de síntomas tras la menopausia (Häfner y cols., 2003). En mujeres con esquizofrenia los síntomas parecen empeorar en situaciones de bajos niveles de estradiol como el periodo premenstrual y tras el parto (Seeman, 1996; Hendrick y cols., 1996; Kendell y cols., 1987) mientras que mejoran en situaciones de alta concentración de estradiol y progesterona como el embarazo (Chang y Renshaw, 1986). También en hombres esquizofrénicos se ha observado una correlación negativa entre los síntomas negativos y los niveles de estradiol (Kaneda y Ohmori, 2005). En sus trabajos, Kulkarni describe como la administración de estradiol a hombres y mujeres con esquizofrenia mejora sus síntomas (Kulkarni y cols., 2001; Kulkarni y cols., 2002; Kulkarni y cols., 2011). Asimismo el tratamiento con estradiol y también con progesterona, mejora el desempeño en conductas relevantes para la esquizofrenia como la inhibición prepulso y la inhibición latente en roedores y humanos (Häfner y cols., 1991; Gogos y Van den Buuse; 2004; Gogos y cols., 2005; Arad y Weiner, 2010).

Al igual que la depresión, en esta enfermedad aparecen anomalías en la expresión de citoquinas proinflamatorias, y se ha observado una correlación entre la neuroinflamación y la severidad de los síntomas (Cazzullo y cols., 1998; Maes y cols., 1995) que también se da en modelos animales de esquizofrenia por infección prenatal (Romero y cols., 2007), por lo que el estradiol podría inducir mejoras en los síntomas mediante acciones antiinflamatorias. Además, en la esquizofrenia se dan alteraciones en la actividad de varios neurotransmisores, como la dopamina y el glutamato (Abi-Dargham y cols., 1998; Olney y Farber, 1995) y el estradiol ha demostrado en numerosos estudios ser capaz de modularlos (Etgen y García-Segura, 2009). También es posible que la progesterona aporte cierta protección. En estudios con ratas, la progesterona ha demostrado

ser capaz de prevenir deterioros en la inhibición prepulso causados por un agonista de los receptores de serotonina (Gogos y Van den Buuse; 2004), asimismo, la progesterona también presenta propiedades neurolépticas (Rupprecht y cols., 1999). Si unimos esto al hecho de que se da una mayor incidencia de psicosis tras el parto (Kendell y cols., 1987), en que hay una abrupta disminución de los niveles de progesterona, nos hace pensar que también la progesterona puede estar interviniendo en el dimorfismo sexual que se observa en esta enfermedad.

La esquizofrenia en humanos se ha asociado también con niveles reducidos de IGF-1 en suero (Venkatasubramanian y cols., 2007; Venkatasubramanian y cols., 2010) y el IGF-1 ha demostrado tener efectos antidepresivos en modelos animales y en humanos (Mitschelen y cols., 2011; Park y cols., 2011; Cassilhas y cols., 2010). Puesto que el estradiol y el IGF-1 regulan conjuntamente la actividad de Akt y GSK-3 β , que han sido implicadas en varias patologías psiquiátricas (Beaulieu, 2011) es posible que la aparente protección que brinda el estradiol también sea mediada por la regulación conjunta que ejerce con IGF-1.

MODULADORES SELECTIVOS DE LOS RECEPTORES DE ESTRÓGENO

Como comentábamos en el apartado previo, la terapia con estradiol o estradiol y progesterona mejora los síntomas en numerosas enfermedades psiquiátricas o degenerativas del sistema nervioso. Sin embargo, su utilización tiene la limitación de que puede causar efectos periféricos indeseados, como un aumento del riesgo de sufrir cáncer de mama y enfermedades cardiovasculares (Rossouw y cols., 2002; Chlebowski y cols., 2003). Una posible alternativa terapéutica al uso de la terapia hormonal son los moduladores selectivos de los receptores de estrógeno (SERMs). Los SERMs son moléculas capaces de unirse a los receptores de estrógeno con la particularidad de que en algunos tejidos actúan como agonistas y en otros tejidos como antagonistas (Arevalo y cols., 2011).

Los SERMs ejercen sus acciones a través de su unión a los receptores de estrógeno α y β . Tras la unión del SERM, los receptores dimerizan y se translocan al núcleo donde al igual que el estradiol ejercen acciones transcripcionales (Shang y cols., 2000). También se ha propuesto que pueden actuar por medio de mecanismos rápidos que regulan la actividad

de las vías de MAPK y PI3K de la misma forma que el estradiol y muestran actividad antioxidante, aunque sólo a altas concentraciones (Dhandapani y cols., 2002).

Los SERMs utilizados en esta tesis, tamoxifeno y raloxifeno son de primera y segunda generación respectivamente. El tamoxifeno ha demostrado poseer actividad anticancerígena en tumores de mama (Cole y cols., 1971) por lo que es utilizado frecuentemente para tratar este tipo de cáncer. El raloxifeno también posee actividad anticancerígena al actuar como antagonista del estradiol en útero y mama (Purdie y Beardsworth, 1999) y protege de la disminución de densidad ósea por lo que se utiliza como tratamiento y prevención de la osteoporosis postmenopáusica (Vogelvang y cols., 2006).

Además de estos efectos a nivel periférico, ambos compuestos poseen actividad neuroprotectora similar en algunos casos a la del estradiol (Arevalo y cols., 2011). Tanto el tamoxifeno como el raloxifeno presentan capacidad antiinflamatoria en células de glía en modelos de inflamación por LPS y en modelos de lesión penetrante reduciendo la activación glial (Tapia-Gonzalez y cols., 2008; Barreto y cols., 2009). También se han observado efectos protectores en modelos animales y en estudios en humanos en Alzheimer (O'Neill y cols. 2004; Breuer y Anderson 2000; Du y cols. 2004), Parkinson (Mickley y Dluzen 2004, Bourque y cols. 2007; Grandbois y cols. 2000, Callier y cols., 2001, Morissette y cols., 2008b) y esclerosis múltiple (Bebo y cols., 2009). El tamoxifeno y el raloxifeno también favorecen la cognición: en un estudio de nuestro grupo se demostró que ambos eran capaces de revertir el deterioro en memoria inducido por la orquidectomía en ratas macho (Lagunas y cols., 2011). También en humanos, se ha descrito que en mujeres postmenopáusicas y hombres mayores sanos el raloxifeno previene la demencia y el deterioro cognitivo (Yaffe y cols., 2005; Goekoop y cols., 2006).

El raloxifeno a la dosis de 1mg/kg disminuye el comportamiento depresivo y ansioso en ratas ovariectomizadas (Karahancer y cols., 2008). Incipientes estudios en humanos empiezan también a sugerir un efecto positivo del raloxifeno reduciendo los índices de ansiedad y depresión en mujeres postmenopáusicas (Carranza-Lira y cols., 2007, Jarkova y cols., 2002; Strickler y cols., 2000; Karsidag y cols., 2010). Los datos experimentales sugieren que el raloxifeno ejerce una acción similar al estradiol en el

sistema serotoninérgico, lo que podría formar parte de su mecanismo regulador del estado de ánimo (Bernardi 2003; Bethea y cols, 2002; Cyr y cols., 2000). Respecto al tamoxifeno, no existen estudios sobre sus efectos en depresión en animales, pero sí se ha observado que reduce la ansiedad en ratas ovariectomizadas. (Kazakova y cols., 2007). También se han detectado efectos beneficiosos del tratamiento con tamoxifeno en episodios maníacos en mujeres con trastorno bipolar (Kulkarni y cols. 2006, Zarate y cols. 2007) y se ha observado que reduce los comportamientos de tipo maníaco inducidos por anfetamina en ratas (Einat y cols. 2007). Debido a estas características, los SERMs podrían tener un potencial terapéutico en enfermedades como la depresión y la esquizofrenia, motivo por el cual fueron incluidos en esta tesis.

OBJETIVOS

Objetivos

OBJETIVO GENERAL

Estudiar los efectos conductuales, histológicos y bioquímicos de la privación de hormonas gonadales, el tratamiento con progesterona, estradiol y SERMs y el posible dimorfismo sexual en dos modelos de patologías psiquiátricas.

OBJETIVOS CONCRETOS

-Estudiar el efecto de la privación de hormonas gonadales y su interacción con el estrés crónico en comportamientos relevantes para la depresión y la ansiedad.

- Estudiar el efecto de la privación de hormonas gonadales y su interacción con el estrés crónico en células de glía y proliferación celular en hipocampo.

-Comprobar si es posible revertir los comportamientos tipo depresión y ansiedad mediante tratamientos con estradiol, progesterona o los SERMs raloxifeno y tamoxifeno.

-Determinar si existen alteraciones en IGF-1 y MAPK en un modelo de esquizofrenia por inyección prenatal de LPS.

-Determinar si existen alteraciones cognitivas en dicho modelo, si estas son dependientes del género y si se ven afectadas por la privación de hormonas gonadales.

-Estudiar si es posible revertir las alteraciones cognitivas provocadas por el tratamiento de LPS prenatal mediante tratamientos con estradiol, progesterona o los SERMs ramoxifeno y raloxifeno.

-Comparar el efecto del tratamiento prenatal con LPS dependiendo del género en comportamientos relevantes para la esquizofrenia y actividad dopaminérgica, y determinar el efecto de la privación de hormonas gonadales y/o el tratamiento con estradiol.

-Estudiar el efecto dependiendo del género de marcadores de inflamación en animales tratados prenatalmente con LPS, así como la influencia de la privación de hormonas gonadales y/o el tratamiento con estradiol.

Objetivos



MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales y métodos

1. Diseño experimental.

1.1. Estrés crónico y privación hormonal.

Animales

Para este estudio se emplearon ratones hembra C57/BL6 de 7 semanas de edad, obtenidos de Harlan Interfauna Ibérica S.L. Se mantuvieron en el animalario de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid en condiciones constantes de temperatura y humedad, en un régimen de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad encendiéndose las luces a las 8:00 p.m. con agua y comida *ad libitum*. El protocolo de Estrés Crónico Impredecible (ECI) se realizó cuando los ratones tenían 6 meses de edad, y los experimentos conductuales y el sacrificio para la toma de muestras se realizó con 7 meses de edad. Los animales fueron manejados en todo momento siguiendo las guías marcadas por la Unión Europea (Directiva 86/609/EEC y 2010/63/UE) y el Real Decreto 1201/2005 de 10 de octubre, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos (BOE nº 252, de 21 de octubre, p. 34367). Todos los experimentos de comportamiento fueron realizados en el periodo de oscuridad.

Estudio del efecto del Estrés Crónico Impredecible y la ovariectomía de corta y larga duración

En este bloque de experimentos se comparó el efecto de la privación hormonal por ovariectomía (ovx) de corta y larga duración y del ECI en varias pruebas conductuales relevantes para la ansiedad y depresión. También se analizaron moléculas en cerebro y suero relacionadas con la respuesta al estrés, el estado de activación glial que es relevante para la plasticidad neuronal y la ruta de IGF-1 implicada en mecanismos de señalización por estradiol en sistema nervioso. El protocolo de estrés crónico utilizado fue una versión modificada del descrito por Moreau (Moreau y cols., 1992). Este se llevó a cabo durante 4 semanas, e incluyó varios estresores como aislamiento social, exposición a depredador (rata), serrín humedecido, jaula inclinada, etc. (figura 4). No incluimos estresores como privación de alimentos o agua para que se asemejara más a una situación de estrés psicológico.

Materiales y métodos

| | | | | | | | |
|-------|--------------------|---|--|----------------------------------|------------------------------------|----------------------|----------------------|
| Día | Control de peso | Cambios de habitación y jaula cada hora durante 7 horas | Serrín de rata en la jaula (1 hora) e introducción de la jaula en una jaula con una rata (2 horas) | Test de preferencia por sacarosa | | | Iluminación continua |
| Noche | Aislamiento social | Emparejamiento con un ratón extraño en la jaula | Test de preferencia por sacarosa | Serrín humedecido en la jaula | o Inclinación de la jaula (45°) | Iluminación continua | Iluminación continua |

Figura 4: protocolo de estrés crónico impredecible (ECI)

Los grupos experimentales fueron: un primer grupo de animales ovariectomizados a los dos meses de edad (ovx4m) y que por tanto contaban con 4 meses de privación hormonal al inicio del ECI; un segundo grupo de ratones que fueron ovariectomizados a los 5 meses y dos semanas de edad (ovx1.5m), por lo que contaban con 2 semanas de ovariectomía al inicio del ECI y un tercer grupo de ratones control que permaneció intacto (int). A su vez cada grupo se dividió en dos subgrupos, Estrés (E), que fue sometido al protocolo de ECI durante 4 semanas y No Estrés (NE) que fue dejado en sus jaulas sin molestarles (figura 5). Se utilizaron distintos ratones para el test de natación forzada (NF) y para el laberinto en cruz elevado (LCE). Los grupos de ratones que realizaron los test de comportamiento, también fueron evaluados en el test de consumo de sacarosa un día por semana durante el ECI. El número de animales utilizado fue 8-10 animales/grupo experimental para los experimentos de conducta, 3-5 jaulas/grupo experimental para la preferencia por sacarosa (los resultados se promediaron para el número de animales por cada jaula) e 4-6 animales/grupo experimental para la inmunohistoquímica y la determinación de corticosterona.

Materiales y métodos

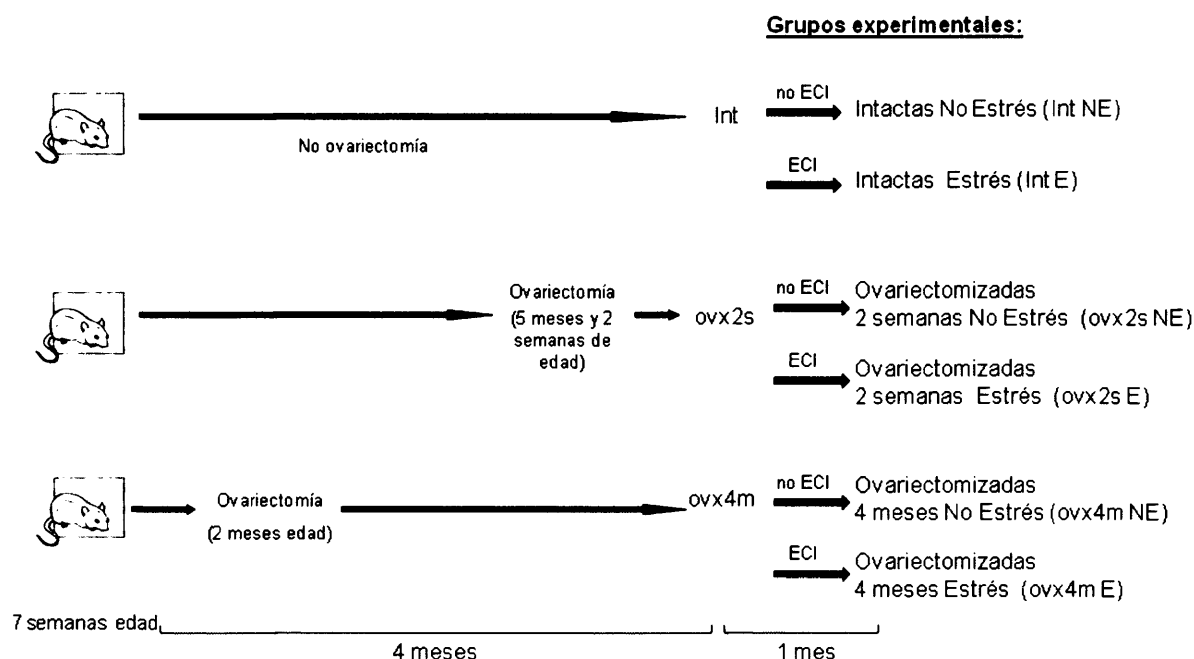


Figura 5: grupos experimentales

Dentro de los citados grupos experimentales, se reservaron ratones que no habían realizado ninguna prueba de comportamiento y que fueron sacrificados 24 horas después del fin del ECI por perfusión para la toma de muestras de cerebro y sangre.

Efectos de la progesterona, el estradiol y de moduladores selectivos de los receptores de estrógeno en animales ovariectomizados y sometidos a Estrés Crónico Impredecible

La interacción entre la privación hormonal de larga duración y el ECI tuvo efectos especialmente prominentes en los test de comportamiento (ver Resultados) por lo que en este segundo bloque de experimentos, se trabajó con ratones con ovariectomía de 4 meses, sometidos al ECI y tratados con progesterona, estradiol, moduladores selectivos de los receptores de estrógeno (SERMs) o vehículo. Como grupo control se utilizaron ratones intactos no estresados (Cont). Así, los grupos experimentales fueron: Cont (intactos, no estrés+vehículo), ovxS (ovx, estrés+vehículo), ovxS-E2 (ovx, estrés+estradiol), ovxS-P4 (ovx, estrés+progesterona), ovxS-T (ovx, estrés+tamoxifeno) y ovxS-R (ovx, estrés+raloxifeno).

Los tratamientos hormonales utilizados fueron 17β -estradiol 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (E2758; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO; 50 μg), raloxifeno 1mg/kg (R1402; Sigma-Aldrich;

Materiales y métodos

1 mg/kg), tamoxifeno (T5648; Sigma-Aldrich; 1 mg/kg) o progesterona (Sigma-Aldrich; 1 mg/animal). Las dosis de progesterona y estradiol fueron elegidas basándonos en trabajos previos donde se demostró que poseían efectos conductuales (Walf y Frye, 2009; Frye et al 2004). Las dosis elegidas de tamoxifeno y raloxifeno han demostrado ser antiinflamatorias y mejorar el aprendizaje en ratas castradas en estudios de nuestro laboratorio (Barreto 2008; Lagunas 2011).

Todos los tratamientos se administraron por inyección subcutánea, disueltos en aceite de sésamo, y los animales vehículo fueron inyectados sólo con este. Se utilizaron 8-10 animales por grupo experimental

1.2. LPS prenatal

Animales

Para estos experimentos se utilizaron ratas Wistar nacidas de hembras obtenidas de Harlan Ibérica Interfauna o Charles Rivers (QC, Canada) según el lugar de realización del experimento. Se mantuvieron en condiciones constantes de temperatura y humedad, en un régimen de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad encendiéndose las luces a las 8:00 p.m. con agua y comida *ad libitum*.

Inyección prenatal de LPS

Para generar los animales sujetos del estudio, se inyectaron subcutáneamente y diariamente ratas Wistar desde el día 1 de gestación hasta el parto, con LPS 1 mg/kg (Lipopolisacárido de *Escherichia coli*, Sigma L-3755 Serotipo 026:B6). El LPS fue disuelto en salino (NaCl 0.9%) e inyectado a un volumen de 1.5 mL/kg. Los animales control fueron los descendientes de ratas gestantes tratadas sólo con el salino, durante los mismos días y de la misma forma que las anteriores. Este esquema de tratamiento fue definida en base a estudios anteriores y recomendaciones de su autor (Borrell, 2002).

Materiales y métodos

Efecto del LPS prenatal, género y privación de hormonas gonadales sobre el Reconocimiento de Objetos y la ruta de señalización del IGF-1

Los grupos experimentales fueron ratas machos y hembras tratadas prenatalmente con LPS o salino (grupos LPS y Sal). Todos los grupos fueron sometidos al test de reconocimiento de objetos (RO) para evaluar el desempeño en una labor cognitiva. Posteriormente algunos animales fueron sacrificados y se diseccionaron distintas zonas del cerebro para medir proteínas de la ruta de señalización del IGF-1.

En un segundo experimento de RO, se castraron ratas machos y hembras, LPS y salino para evaluar el efecto de la privación hormonal sumada al LPS prenatal. De esta forma, los grupos experimentales fueron en ratas macho: ratas tratadas prenatalmente con salino sham (Sal sham), ratas tratadas prenatalmente con Sal orquidectomizadas (Sal okx), ratas tratadas prenatalmente con LPS sham (LPS sham) y ratas tratadas prenatalmente con LPS orquidectomizadas (LPS okx). Y en el caso de las hembras los grupos fueron: ratas tratadas prenatalmente con salino sham (Sal sham), ratas tratadas prenatalmente con Sal ovariectomizadas (Sal ovx), ratas tratadas prenatalmente con LPS sham (LPS sham) y ratas tratadas prenatalmente con LPS ovariectomizadas (LPS ovx). Se utilizaron entre 5 y 7 animales por grupo experimental para los Western Blot, y 11-13 animales por grupo experimental para los experimentos de reconocimiento de objetos.

Efectos de la progesterona, el estradiol y de moduladores selectivos de los receptores de estrógeno sobre el reconocimiento de objetos en animales tratados prenatalmente con LPS

Para este estudio se utilizaron únicamente ratas macho tratadas con LPS prenatal, ya que previamente se manifestó que mostraban un deterioro en el reconocimiento de objetos. Los animales se sometieron a la tarea de RO tras un pretratamiento con estradiol, progesterona, tamoxifeno o raloxifeno para determinar si modificaban el efecto del LPS prenatal en dicha tarea.

Los compuestos utilizados fueron los mismos que en el bloque de Estrés Crónico a las siguientes dosis: 17 β -estradiol 50 μ g/kg (E2758; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO; 50 μ g), raloxifeno 1mg/kg (R1402; Sigma-Aldrich; 1 mg/kg), tamoxifeno (T5648; Sigma-

Materiales y métodos

Aldrich; 1 mg/kg) o progesterona (Sigma, 2 mg/kg). La dosis de estradiol se eligió en base a que produce efectos antiinflamatorios tras inyección de LPS (Tapia-Gonzalez 2009) y la dosis de progesterona hemos observado en un experimento previo que muestra cierto efecto protector en deterioro de inhibición prepulso inducido por apomorfina o MK-801 (datos no publicados), que constituye un modelo de esquizofrenia en ratas. Se utilizaron entre 10-13 animales por grupo experimental.

Efecto del LPS prenatal, género y tratamiento con estradiol en Hiperlocomoción Inducida por Anfetamina e Inhibición Prepulso

Estos experimentos y los siguientes fueron realizados durante la estancia en el laboratorio del Dr. Giamal Luheshi, en el Douglas Mental Health University Institute (Montreal, Quebec, Canada).

Para ellos se estudiaron por separado machos y hembras (figura 6). En los experimentos con machos, se utilizaron machos de 2 meses de edad tratados prenatalmente con LPS o salino. 24 horas antes de la inhibición prepulso (IP), un grupo de LPS prenatal y otro de salino se trataron con estradiol y otros dos grupos de LPS y salino respectivamente, se trataron con vehículo. Tras una semana, se realizó un experimento de actividad locomotora basal, para confirmar que no existían diferencias entre grupos, y se repitió el tratamiento agudo con estradiol y vehículo. 24 horas después se realizó el experimento de hiperlocomoción inducida por anfetamina (HIA).

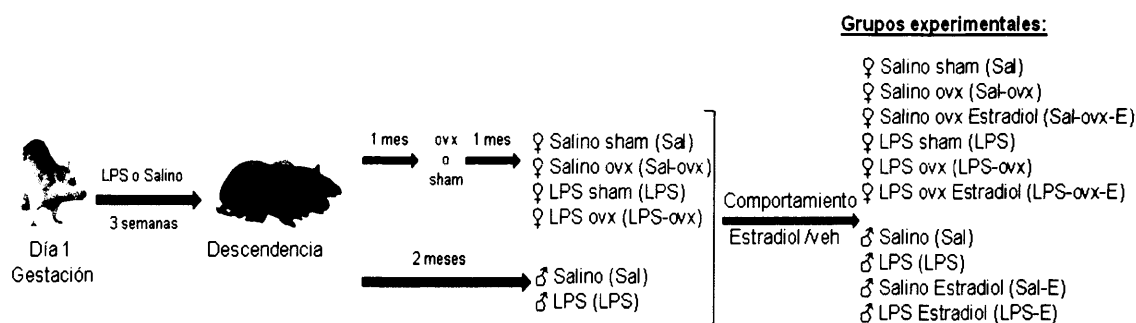


Figura 6: Grupos experimentales

Finalmente, se dejó una semana más de descanso a las ratas, se realizó una nueva inyección de estradiol y vehículo y algunos animales de cada grupo experimental fueron sacrificados por decapitación para recogida de muestras de cerebro y sangre.

Materiales y métodos

En hembras se utilizaron igualmente animales tratados con LPS o salino. Además en este caso, parte de los animales fueron ovariectomizados o sometidos a una falsa operación al mes de edad para estudiar los efectos de la privación hormonal prepuberal. Finalmente, parte de los animales ovariectomizados, fueron sometidos a un tratamiento agudo con estradiol 24 horas antes de cada test conductual siguiendo el mismo esquema temporal que en los machos (figura 7)

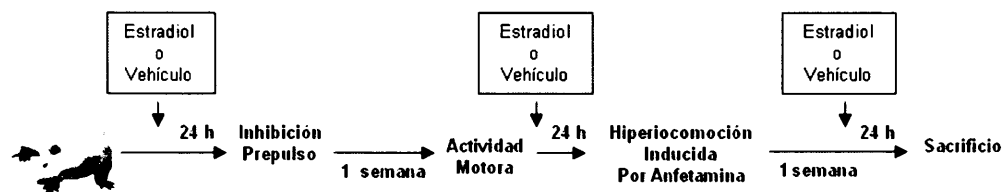


Figura 7: esquema temporal de experimentos de comportamiento y tratamiento hormonal

Los tratamientos con estradiol, consistieron en una inyección subcutánea de 17β -estradiol (E2758; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO; 50 μ g) 24 horas antes de cada test conductual y del sacrificio, a una dosis de 100 μ g/kg, dosis que se obtuvo de uno de los trabajos mencionados anteriormente (Barreto y cols., 2009). La cantidad de animales utilizada fue de 14-16 animales por grupo experimental para las ratas macho, y 12-14 animales por grupo experimental para ratas hembra.

Efecto del LPS prenatal, género y tratamiento con estradiol sobre los niveles basales de citoquinas en suero y sobre la actividad proinflamatoria y dopaminérgica en cerebro.

Tras la realización de los experimentos de comportamiento y tratamientos, algunos animales de cada uno de los grupos experimentales descrito anteriormente, fueron sacrificados. Se tomaron muestras de cerebro y suero, para cuantificar citoquinas en suero y ciclooxigenasa 2 (COX-2) en cerebro, como indicadores de actividad pro-inflamatoria y tiroxina-hidroxilasa (TH) como indicador de actividad dopaminérgica.

La cantidad de animales utilizada fue de 6 animales por grupo experimental para los Western Blot, y de 10 animales por grupo experimental para la determinación de citoquinas por ELISA

2. Protocolos y reactivos.

2.1. Conducta

Natación Forzada



El test de natación forzada (NF), un método aceptado para medir comportamiento de tipo depresivo, está basado en el protocolo desarrollado por Porsolt (Porsolt y cols., 1979).

Para realizar el test se utilizó un cilindro transparente de metacrilato (30x11 cm) con 20 cm de agua a 25 °C. Cada animal fue introducido en el cilindro y se grabó su comportamiento durante 5 minutos. Posteriormente, se cuantificó el tiempo empleado en cada uno de los siguientes comportamientos: *climbing* (con el animal en posición vertical, moviendo las cuatro patas vigorosamente, las patas delanteras tocando la pared del cilindro y las traseras moviéndose rápidamente al mismo tiempo), natación (con el ratón en posición horizontal, moviendo las cuatro patas suavemente y desplazándose), flotación (con el animal moviéndose de forma que no se puede considerar *climbing* o natación) e inmovilidad (el animal flota sin realizar ningún movimiento). El tiempo de inmovilidad se consideró como índice de comportamiento de tipo depresivo.

Laberinto en Cruz Elevado

El laberinto en cruz elevado (LCE) es un test aceptado para medir estados de ansiedad en roedores. Dicho test fue desarrollado por Pellow, con su consiguiente validación farmacológica (Pellow y cols., 1985). Consiste en una estructura en cruz con dos brazos abiertos (30 cm de largo, 5 cm de ancho y paredes de 0,25 cm de alto) y dos brazos cerrados (30 cm de largo, 5 cm de ancho y paredes de 25 cm de alto) que surgen de una zona central común (5x5 cm). El aparato está elevado 60 cm sobre el nivel del suelo. El día de realización del experimento los animales se llevaron al cuarto 1 hora antes del inicio del experimento para su adaptación a la habitación. Cada ratón fue inicialmente posicionado en la zona central y luego se le dejó explorar libremente el LCE durante 5 minutos. Las sesiones fueron grabadas en video para su posterior análisis. Se midió el tiempo pasado en los brazos abiertos, lo que se considera que refleja de una manera inversamente proporcional el perfil ansiogénico del animal.

Materiales y métodos

Test de consumo de sacarosa o anhedonia

El procedimiento utilizado fue una modificación del publicado por Rygula (Rygula y cols., 2005). Esta prueba está ampliamente aceptada en modelos animales de depresión como indicador de comportamiento anhedónico, ya que la anhedonia es uno de los síntomas centrales de la depresión mayor. La preferencia por la sacarosa se midió una vez por semana a partir de los 6 meses de edad. Para esta prueba se preparó una solución de sacarosa al 8% en agua. Esta concentración de sacarosa ha demostrado ser la preferida por la cepa C57/BL6 (Pothion y cols, 2004).

Previamente se sometió a los ratones a un periodo de 10 días de habituación a la sacarosa en los que tenían constantemente un biberón con agua y otro con la sacarosa al 8%. Tras este periodo, se retiró la sacarosa y a partir de los 6 meses de edad se realizó el test semanalmente, siempre el mismo día (miércoles) hasta los 7 meses de edad en que fueron sacrificados o realizaron otros test de comportamiento. El día de la prueba a las 20:00 se les ponía en la jaula un biberón con la solución de la sacarosa y un biberón con agua previamente pesados. 12 horas después se cambiaban de sitio los biberones para evitar que el consumo se viera afectado por preferencias de lugar y finalmente 24 horas después se pesaban de nuevo los biberones de agua y sacarosa. El índice de comportamiento anhedónico fue calculado como la preferencia por la solución de sacarosa expresándose esta como el porcentaje de sacarosa consumida respecto al consumo total de líquidos.

Al inicio del protocolo, cuando los ratones tenían 6 meses de edad, se midió el peso de todos los grupos experimentales, y esta medida fue repetida de nuevo 4 semanas después (7 meses de edad).

Reconocimiento de objetos

El test de reconocimiento de objetos (RO) se utiliza frecuentemente para medir aspectos cognitivos en roedores. Este test fue propuesto por primera vez por Ennaceur (Ennaceur y Delacour, 1988) y es considerado como relevante para estudiar déficits cognitivos en modelos de esquizofrenia (Fujita y cols, 2008; Grayson y cols, 2007; Hashimoto y cols, 2005). Existen varias formas de realizar este test. En nuestro caso utilizamos el protocolo descrito por Vigano (Vigano y cols, 2008) puesto que es sensible

Materiales y métodos

al tratamiento por fenciclidina, que constituye un modelo de esquizofrenia aceptado (Mouri y cols, 2007), y al tratamiento con antipsicóticos como control positivo.

Una hora antes del test, las ratas fueron llevadas a la habitación donde este se realizó para su habituación al entorno. El experimento siempre fue realizado en el periodo de luz (11:00-19:00), pero la habitación estaba iluminada con luz roja para favorecer la actividad de los animales. El aparato donde se llevó a cabo fue una caja de campo abierto (60x60x60 cm) de material negro metálico con el suelo dividido en cuadrículas (10x10cm) para facilitar la medida de actividad motora. Cada rata realizó una primera sesión de familiarización en la caja de 10 minutos, donde fue expuesta a dos objetos iguales. Tras esta fase el animal se volvió a dejar en su jaula, y una hora después se volvió a introducir en la caja durante 3 minutos, en esta ocasión junto a un objeto de la primera sesión (objeto conocido) y un objeto nuevo. Entre un animal y otro, y una fase y otra, siempre se limpiaron el campo abierto y los objetos con alcohol al 70% para evitar olores que pudieran interferir con la exploración de los objetos. Todas las sesiones fueron grabadas con una cámara de video situada encima del aparato (anclada en el techo) para su posterior evaluación.

Los parámetros medidos fueron tiempo de exploración total y actividad motora en la primera fase, y tiempo de exploración del objeto conocido, tiempo de exploración del objeto nuevo y tiempo de exploración total (exploración objeto conocido + exploración objeto nuevo) en la segunda fase. El Índice de Discriminación (ID), que cuantificaría cuánto se acuerda el animal del objeto conocido y lo diferencia del nuevo mediante una mayor exploración de este, se calculó como el porcentaje de tiempo de exploración del objeto nuevo respecto a la exploración total en la segunda fase del test ($ID = (\text{Explor obj nuevo} / \text{Explor obj conocido} + \text{Explor obj nuevo}) * 100$). Se define la exploración como el tiempo que el animal pasa oliendo, lamiendo o tocando los objetos con las patas delanteras mientras los huele, pero no cuando se apoya en este, apoya las patas, se sienta en él, o se limita a estar a su lado o moverse alrededor. La actividad locomotora se midió como desplazamiento de la rata en la primera fase del test, se cuantificó la cantidad de veces que cada animal cruzó una línea de la cuadrícula dibujada en el suelo del campo abierto. Los tiempos de exploración son medidas importantes para descartar que una disminución del ID se deba simplemente a una disminución en el tiempo de exploración, y a su vez una actividad motora disminuida podría explicar casos de menor tiempo de exploración.

Materiales y métodos

En los experimentos de reconocimiento de objetos en los que se utilizaron hembras intactas, no se evaluó la fase del ciclo estral para no introducir un estrés previo a la prueba.

Inhibición Prepulso

Se midió la respuesta basal de sobresalto acústico y la inhibición prepulso (IP) utilizando 5 cajas SR-LAB (San Diego Instruments, San Diego, USA), basándonos en un protocolo utilizado anteriormente (Aguilar-Valles y Luheshi, 2010). Este experimento y los posteriores (Actividad Motora y HIA) se realizaron siempre en el periodo de luz, entre las 9 y 16 horas.

Cada sesión comenzó con un periodo de aclimatación de 5 minutos en presencia de ruido blanco de 70 dB que continuó durante todo el experimento. En primer lugar se presentaron 2 pulsos de 120 dB (30ms) que no se tomaron en cuenta para los cálculos posteriores, seguidos por otros 10 pulsos idénticos (120 dB, 30 ms), 5 pulsos nulos sin estímulo y 5 prepulsos+pulso a cada una de las 5 intensidades de prepulso que fueron testadas en un orden al azar, con una media de tiempo entre un ensayo y otro de 17 segundos (rango: 9-29 s). Los ensayos de prepulso+pulso consistieron en un prepulso de 30 ms a 73, 76, 79, 82 y 85 dB (correspondiente por tanto a 3, 6, 9, 12 y 15 dB por encima del ruido de fondo), seguido tras 70 ms por un pulso de sobresalto (120 dB, 30 ms). Cada sesión experimental duró 15 minutos. Los resultados fueron expresados como porcentaje de Inhibición Prepulso (%IP) definida como: $\%IP = 1 - (\text{amplitud de sobresalto en prepulso+pulso}) / \text{media de respuesta de sobresalto} \times 100$.

Actividad Motora Basal

24 horas antes de estudiar la hiperlocomoción inducida por anfetamina (HIA), se realizó un experimento de actividad locomotora basal para establecer si había diferencias entre grupos en este parámetro. Para ello se utilizaron actímetros consistentes en cajas de metacrilato equipadas con células infrarrojas (Accu Scan Instruments, Inc. Columbus, OH, USA). Cada rata fue testada durante 30 minutos, recogiendo los datos (distancia recorrida en cm) por periodos de 10 minutos mediante el software de Versamax (version 4.0, 2004); AccuScan Instruments, Inc., Columbus, OH, USA. Tras este experimento, las ratas fueron inyectadas con su correspondiente tratamiento (17 β -Estradiol o vehículo) para realizar 24 horas después el estudio de la HIA.

Hiperlocomoción Inducida por Anfetamina

El protocolo utilizado se basó en otros publicados anteriormente (Yetnikoff y cols, 2007; Aguilar-Valles y cols, 2010). El día del test, se realizó primero un periodo de 30 minutos de habituación al inicio del cual cada animal fue inyectado intraperitonealmente con NaCl al 0.9% y su actividad locomotora fue grabada. A continuación, los animales se inyectaron intraperitonealmente con 2 mg/kg de anfetamina (d-AMPH sulfato, Sigma-Aldrich, Dorset, Reino Unido) y su actividad locomotora fue grabada durante 90 minutos más, también por periodos de 10 minutos.

2.2. Cirugía, sacrificio y toma de muestras.

Ovariectomía y orquidectomía

En los experimentos correspondientes, algunos animales fueron gonadectomizados. Para ello se utilizó como anestesia inhalatoria isoflurano (INIBSA, Nicholas Piramal Limited, Reino Unido). Como mínimo siempre se dejó una semana de recuperación tras la operación antes de comenzar los experimentos. En los grupos en que se realizó la falsa operación (sham), los animales fueron anestesiados, se les practicó una pequeña incisión con bisturí similar a la de los animales operados, y se volvió a cerrar el corte con grapas.

Sacrificio y toma de muestras

En los experimentos correspondientes al bloque de Estrés Crónico, algunos animales fueron sacrificados por perfusión para realizar posteriores inmunohistoquímicas con cerebro. Para ello, los ratones fueron anestesiados con pentobarbital sódico (100 mg/kg peso corporal, Normon División Veterinaria, Madrid, España) y después fueron perfundidos a través del ventrículo izquierdo, en primer lugar con 50 ml de solución salina (NaCl al 0,9%) y a continuación con 100 ml de fijador (paraformaldehído al 4% en tampón fosfato 0,1M; pH 7,4). Los cerebros se mantuvieron durante una noche en el mismo fijador a 4°C; posteriormente se embebieron en solución crioprotectora (sacarosa al 30% y etilglicerol al 30% en tampón fosfato 0,1 M) y se almacenaron a -20°C hasta su posterior utilización. En el momento de utilizar los cerebros, se hicieron cortes frontales de 50 µm de grosor utilizando un vibratomo (VT 1000 S, Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania).

Materiales y métodos

Posteriormente se seleccionaron los cortes que contenían el hipocampo para los experimentos de inmunohistoquímica.

En los experimentos que se usaron ratas, estas fueron sacrificadas por decapitación y se recogieron sus cerebros. Para los experimentos de Western Blot de receptores de estrógeno e IGF-1, vía de PI3K y vía de las MAPK, estos fueron diseccionados en el momento tomándose muestras de corteza prefrontal, hipocampo, hipotálamo y cerebelo, que fueron congeladas inmediatamente en nieve carbónica. Para los Western Blot de COX-2 y TH los cerebros fueron almacenados enteros a -80 °C y posteriormente cortados en rodajas de 300µm de grosor en un criostato. A partir de estas rodajas se obtuvieron por perforación corteza prefrontal, núcleo accumbens y estriado de acuerdo al atlas de cerebro de rata de Paxinos y Watson (Paxinos y Watson, 1998).

Asimismo, en el momento del sacrificio se recogió sangre del tronco. La sangre se centrifugó a 5300g durante 15 minutos, para separar el suero, que fue conservado a -80°C hasta su utilización.

2.3. Inmunohistoquímica.

GFAP, NG2 e IBA-1

La inmunohistoquímica para GFAP, NG2 e IBA-1 se llevó a cabo en cortes flotantes bajo agitación moderada. Todos los lavados e incubaciones se llevaron a cabo en tampón fosfato 0.1M pH 7.4 que además contenía albumina de suero bovino al 3% y tritón X-100 al 0,3%.

La actividad peroxidasa endógena se bloqueó durante 10 minutos a temperatura ambiente con una solución de peróxido de hidrógeno al 3% y metanol al 30%. Tras varios lavados en tampón, los cortes fueron incubados toda la noche a 4°C con un anticuerpo policlonal generado en conejo contra GFAP (dilución 1:2000, Dako Cytomation), NG2 (dilución 1:400, Chemicon) o IBA-1 (Wako, 1:1000). Tras esto, los cortes fueron lavados varias veces en el tampón e incubados 2 horas a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario biotinilado generado en cabra contra las inmunoglobulinas G de conejo (dilución 1:300, Pierce, Rockford, IL, US). Tras varios lavados en tampón los cortes se incubaron a temperatura ambiente con el complejo avidina-biotina.peroxidasa (dilución 1:250;

Materiales y métodos

ImmunoPure ABC peroxidase staining kit, Pierce). El producto de la reacción fue revelado incubando las secciones con 2 µg/ml 3,3'-diaminobenzidina (Sigma-Aldrich, Tres Cantos, España) y peróxido de hidrógeno al 0.01% en tampón fosfato 0.1 M. Finalmente, los cortes fueron deshidratados, montados en portas gelatinizados y cubiertas con DEPEX y cubreobjetos para su posterior análisis.

BrdU

En los experimentos de Estrés Crónico, a algunos animales se les administró bromo-deoxi-uridina (BrdU) por inyección intraperitoneal a una dosis de 50mg/Kg, empleando como vehículo solución salina (NaCl al 0,9%). La BrdU se administró 3 y 4 días antes del sacrificio para evaluar proliferación celular en hipocampo.

Para su detección por inmunohistoquímica se utilizó el mismo protocolo descrito en el apartado anterior, con la diferencia de que previamente a la incubación con el anticuerpo primario, se incubó 30 minutos a 37°C en HCl 2N para desnaturalizar el ADN y dejarlo así accesible a los anticuerpos. El anticuerpo primario utilizado fue anti BrdU generado en ratón (dilución 1:1000; Hybridoma Bank, University of Connecticut, EEUU) y el secundario generado en cabra anti inmunoglobulina G de ratón biotinilado (dilución 1:000 Pierce Rockford, IL, EEUU).

Análisis morfométrico

Para cada inmunohistoquímica se utilizó una serie de cerebro compuesta por 1 de cada 8 cortes consecutivos y dentro de cada serie se seleccionaron los cortes donde el hipocampo aparecía plenamente diferenciado, entre 5 y 8 cortes por animal. Todos los recuentos se realizaron utilizando un microscopio Leica DMRB-E y se hicieron de manera “ciega”, es decir, sin conocer previamente a qué grupo pertenecía cada animal.

Para GFAP e IBA-1, la cantidad de células inmunorreactivas se evaluó en el hilus, dentro de giro dentado. Para ello, se utilizó la técnica de recuento por puntos basada en la descrita por Weibel (1979). Se utilizó un microscopio Leica DMRB-E acoplado a una cámara de vídeo Sony CCD-Iris y a un monitor y en el monitor se colocó una plantilla cuadrículada. Para cada corte se contaron en 4 campos distintos dentro del hilus, el número de puntos de la rejilla que coincidían con material inmunorreactivo. Esta medida dividida

Materiales y métodos

por el número total de puntos se tomó como una estimación del volumen ocupado por células GFAP. La medida para cada animal se obtuvo haciendo la media para cada corte, y con dichas medias calculando un valor promedio como porcentaje.

Para evaluar la cantidad de células con marcaje NG2 se realizó un recuento de células marcadas dentro del giro dentado, en el hilus, utilizando un aumento 10X dentro de una superficie de referencia (la misma para todos los cortes) marcada por una plantilla colocada sobre el monitor, con el mismo equipo que para GFAP. Dicha área de referencia se calculó utilizando un porta calibrado y cada recuento se dividió entre esta, de forma que el resultado se obtuvo como células/mm². Para cada corte se contaron 4 campos, se obtuvo el promedio de estos, y el valor para cada animal se calculó como el promedio de todos los cortes (entre 5 y 7) de ese animal.

Finalmente, el análisis de las células positivas para BrdU se realizó de la siguiente manera: se realizó el recuento en de todas las células con marcaje para BrdU en la capa granular en el giro dentado del hipocampo en ambos hemisferios y se calculó el promedio por corte como la media para ambos lados. A continuación se obtuvo el valor promedio de todos los cortes por cada animal y este valor se multiplicó por 8 (número máximo de series con hipocampo) y finalmente el valor obtenido se multiplicó de nuevo por 8 ya que esta es la cantidad de series completas de cortes de todo el cerebro para obtener un valor aproximado del número total de células marcadas en el hipocampo de cada animal.

2.4. Bioquímica (Western blot)

Receptores de estrógeno y vías de señalización por IGF-1

Las zonas de cerebro que se estudiaron fueron disgregadas mediante un tampón de lisis compuesto por: 20mM Tris-HCl pH 7,4; 150mM NaCl, 10% glicerol, 5mM EDTA y 1% Nonidet P-40 (Roche) e inhibidores de proteasas (50µg/ml PMSF, 25µg/m leupeptina y 10µg/ml aprotinina, Sigma). Tras la homogeneización, se dejaron reposar las muestras en hielo durante 15 minutos y se centrifugaron a 21000g durante 15 minutos. La proteína se recogió en el sobrenadante y se cuantificó la cantidad total mediante colorimetría a 595 nm mediante ensayo con el reactivo Bradford (Bio-Rad). La concentración de proteína por

Materiales y métodos



muestra se ajustó a 50 µg/muestra y las alícuotas ya mezcladas con tampón de carga, fueron mantenidas de -20 °C hasta su utilización.

Para la separación electroforética se calentaron las muestras durante 5 minutos a 95 °C para desnaturalizar la proteína, y se cargaron en geles de acrilamida/bisacrilamida al 10 % para la detección de proteínas de la ruta de IGF-1 y receptores de estrógeno, y al 12 % para BDNF. La composición del tampón de electroforesis fue 25mM TrisHCl pH 8,3; 192mM glicina y 0,1% SDS y la separación se realizó a un voltaje variable (50-120 mV) hasta observar que se habían separado bien las bandas del marcador de peso molecular (New England, BioLabs, 6,5-180KDa). Tras la separación, se transfirieron las proteínas a una membranas de nitrocelulosa con un tampón de transferencia compuesto por: 25mM TrisHCl pH 8,3; 192mM glicina y SDS al 0,02%. La trasferencia se realizó durante 70 minutos a 0.52 mA para geles del 10% y durante 30 minutos para geles del 12%. Posteriormente se marcaron las membranas con rojo Ponceau (Sigma) al 0,1%, en ácido acético al 5%, para visualizar las proteínas.








Las membranas se bloquearon con una solución de leche desnatada en polvo al 5% en Tampón de Tris-HCl salino con Tween-20 (TTBS: 20mM Tris HCl; 137mM NaCl, pH 7,5 y Tween-20 al 0,05%, Sigma) y tras tres lavados de 10 minutos con TTBS (Tampón Tris-HCl salino, Tween-20 al 0,05%) se dejaron incubando, con el anticuerpo primario correspondiente, a 4°C y en agitación suave durante toda la noche.(ver figura 8 para anticuerpos). El día siguiente se repitieron los lavados con TTBS (3x10min) y se incubaron las membranas durante 2 h, a temperatura ambiente en agitación suave, con el anticuerpo secundario conjugado con HRP.

Materiales y métodos



• Receptores de Estrógeno:

| | |
|---|--|
| -Receptor Alfa: antiER α conejo, 1:1000, Santa Cruz Biotech, | Sal LPS |
| |  ER α en Hc |
| -Receptor Beta: antiER β conejo, 1:1000, Zymed |  ER β en CP |

• Ruta IGF-1 y MAP quinasas

| | |
|--|--|
| -Receptor de IGF-1 (subunidad β): anti IGF-1R β conejo, 1:1000, Santa Cruz Biotech |  IGF-1R en Cb |
| -Akt: antiAKT1/2 conejo, 1:2000, Santa Cruz Biotech |  AKT en Cb |
| -FosfoSer474- AKT: anti P-AKT conejo, 1:1000 Cell Signalling |  P-AKT en CP |
| -GSK3: anti GSK3 β ratón, 1:2000, BD Transduction Labs |  GSK3 en Ht |
| -Fosfo Ser9-GSK3 β : anti P-GSK3 β conejo, 1:1000, Cell Signalling |  P-GSK3 en Ht |
| - ERK1/2: anti ERK1/2 ratón, 1:1000 Cell Signalling |  ERK1/2 en Hc |
| - Fosfo-ERK1/2: anti P-ERK 1/2 conejo, 1:1000, Cell Signalling |  P-ERK 1/2 en Cb |

• Control de carga

| | |
|---|--|
| - β -Actina: anti β -Actina ratón 1:4000, NeoMarkers |  β -Actina en Hc |
| - β -Tubulina: anti β -Tubulina ratón, 1:15000, Promega |  β -Tubulina en Hc |

• Anticuerpos secundarios

- anti –ratón, 1:10.000, Bio-Rad
- anti –conejo, 1:10.000, Bio-Rad

Figura 8. Anticuerpos utilizados y ejemplos del marcaje en tejidos del experimento de LPS prenatal. Sal: animales tratados prenatalmente con salino; LPS: animales tratados prenatalmente con LPS; Hc: hipocampo; CP: corteza prefrontal; Ht: hipotálamo; Cb: cerebelo. En todos los casos la primera banda corresponde a un animal control (tratado prenatalmente con salino) y la segunda a un animal tratado prenatalmente con LPS.

Materiales y métodos

Finalmente, se lavaron las membranas con TBS (3x10min), se incubaron con el reactivo de revelado quimioluminiscente (ECL Healthcare- Amersham) durante 1 minuto, y se procedió a su revelado en películas fotosensibles con una maquina reveladora (Curix 60, AGFA).

Las películas obtenidas se escanearon y se cuantificó su densidad óptica mediante el programa de análisis de imágenes “Quantity one” (versión 4.6.1, Bio-Rad). Los niveles de proteína se expresaron normalizados respecto a la β -actina o, en el caso de proteínas fosforiladas, respecto a la cantidad de esa misma proteína total (fosforilada y no fosforilada). Además se expresaron los resultados como un porcentaje respecto a los niveles en las ratas control en cada caso, para poder hacer el promedio de varias membranas.

Ciclo-oxigenasa-2 y tirosina hidroxilasa

Las zonas de estudio del cerebro de rata fueron disgregadas en tampón de lisis (50mm Tris-HCl 50 mM, EDTA 2 mM y Nonidet 1%) que incluía un coctel de inhibición de proteasas de uso común (Sigma-Aldrich). Se cuantificó la cantidad de proteína total en cada muestra utilizando el reactivo Bradford para colorimetría a 595 nm, según las instrucciones del fabricante. Se alicuotaron las muestras ajustándolas a una concentración de proteína total de 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

Las muestras se mezclaron (1:1) con tampón de carga Laemmli (Bio-Rad Laboratories, Mississauga, ON, Canada) al que previamente se le añadió β -mercaptoetanol (50 μl de β -mercaptoetanol por mL de tampón de Laemmli; Sigma-Aldrich). A continuación las muestras se incubaron durante 5 minutos a 95 °C, se cargaron en geles de acrilamida (4–20% Tris-glycine gel, Invitrogen) y las proteínas se separaron por electroforesis a 125 V durante 2 horas. Tras la separación, se realizó la transferencia a membranas de nitrocelulosa (Hybond ECL, Amersham Biosciences Corp., Piscataway, NJ, EEUU) durante 2 horas a 25 V en el módulo Xcell II Blot (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para la inmunodetección, se bloquearon las membranas con una solución compuesta por TBS (tampón Tis-salino 1X), leche en polvo desnatada al 10% (Bio- Rad

Materiales y métodos

Laboratories) y Tween 20 al 0,1% durante 2 horas a temperatura ambiente y con agitación suave. A continuación las membranas se dejaron incubando toda la noche a 4°C en agitación suave, con el anticuerpo correspondiente diluido en la misma solución bloqueante. Tras la incubación se lavó el exceso de anticuerpo (4x15 minutos) con una solución de TBS 1X y Tween al 0,1% y se incubaron las membranas durante una hora con el anticuerpo secundario conjugado (1:2000; burro-anticonejo IgG-HRP, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EEUU; diluido en TBS1X, leche en polvo al 5% y Tween 20 al 0,1%) para la detección posterior.

Tras los lavados (4x15minutos), se incubaron las membranas con los agentes de revelado (ECL Western blotting detection reagents, a 0,125 ml/cm⁻²; de membrana, Amersham Biosciences Corp.) durante 1 minuto, y se expusieron a una película sensible a la quimioluminiscencia (Hyperfilm ECL, Invitrogen) durante 1-5 minutos. Las películas obtenidas se escanearon y se cuantificó su densidad óptica mediante un programa de análisis de imágenes Gene Tool (Syngen, Frederick, MD, USA).

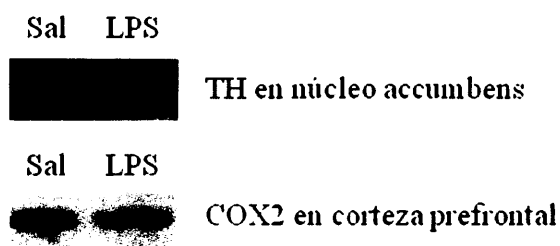


Figura 9: ejemplos de marcaje TH y COX-2 en tejidos del experimento de LPS prenatal

Los anticuerpos primarios utilizados (ejemplos de marcaje en figura 9) fueron anti ciclo-oxigenasa 2 (COX-2), 1:1000 (Cayman Chemical, 160126, anti-COX2), anti-tirosina hidroxilasa (TH), 1:5000 (Chemicon, Temiclula, CA, EEUU; cat. #AB152) y β -actina-HRP, 1:10000 (Santa Cruz, cat. sc-1616) como control de carga. Los niveles de COX-2 y TH se expresaron normalizados con la β -actina y como porcentaje respecto a los niveles en las ratas control (Salino+Veh) para hacer el promedio de varias membranas.

2.5. ELISAs.

Se realizaron estos experimentos en ratas tratadas prenatalmente con LPS (ver figura 2). Las citoquinas ensayadas fueron interleuquina 1 β (IL1 β), interleuquina 6 (IL6), antagonista del receptor de interleuquina 1 (IL1ra) y el factor de necrosis tumoral α (TNF α). Para IL1 e IL6, los niveles resultaron estar por debajo de los límites de detección, por lo que no se incluyen en los resultados.

Los ELISAs se llevaron a cabo a temperatura ambiente, en placas de 96 pocillos. Cada pocillo fue previamente recubierto, mediante incubación toda la noche a 4°C, con los anticuerpos primarios correspondientes hechos en oveja (obtenidos como un regalo del Dr. Stephen Poole, NIBSC The National Institute for Biological Standards and Control, UK) a 1 μ g/mL en 100 μ L de PBS. Al día siguiente, las placas se lavaron 3 veces con el tampón de ensayo (tampón fosfato 0.01M, NaCl 0.05M, Tween-20 al 0.1%, pH 7.4) y a cada pocillo se le agregaron 100 μ L de ovoalbúmina, dejándose por 1 hora. Se realizaron 3 nuevos lavados con el buffer de ensayo, y se añadieron las muestras de suero sin diluir o los estándares (100 μ L/pocillo), tras lo cual, se dejaron incubando durante 2 horas. A continuación, se lavaron los pocillos 3 veces con 250 μ L de tampón de ensayo y se incubaron con los anticuerpos biotinilados correspondientes (purificados y biotinilados en el propio laboratorio según el protocolo de Rees y cols, 1999) durante 1 hora más.

Para la detección, se lavaron las placas 3 veces y se incubaron con el complejo avidina-peroxidasa de rábano (1:500, 100 μ L, Dako Ltd.) durante 15 minutos. Se lavaron los pocillos 3 veces más con 250 μ L de tampón de ensayo, se incubaron 15 minutos con 100 μ L de *o*-fenilendiamina (OPD, 1nM, Sigma, conteniendo 0.4 μ L de H₂O₂ al 30% v/v). Se bloqueó la reacción con 150 μ L de ácido sulfúrico y se cuantificó la densidad óptica a 150 nm en un espectrofotómetro. Para la cuantificación se calculó una curva patrón a partir de los valores de los estándares, y se interpoló la señal (promedio de dos duplicados) de cada muestra, determinándose así la concentración de IL-1ra y TNF- α .

2.6. Análisis estadístico.

La estadística se realizó utilizando los programas SPSS (versión 17) y Data Sim (versión 1.2, desarrollado por Drake R. Bradley, Bates College, Lewiston, USA). Se utilizó siempre el análisis de varianza (ANOVA) de una, dos o tres vías según el tipo de experimento. Para el análisis *post hoc* se utilizó el test de Tuckey. En el caso de comparaciones entre dos grupos (experimentos en ratas macho tratadas prenatalmente con LPS y salino), se utilizó la prueba t de Student para grupos con distintas varianzas, puesto que el test de Levene mostró que sus varianzas eran significativamente diferentes.

Materiales y métodos

RESULTADOS

Resultados

Resultados

1. Estrés crónico y privación hormonal.

1.1. Efecto del estrés crónico y la privación hormonal sobre conducta depresiva y de ansiedad.

Natación Forzada

Los datos de NF y LCE se analizaron por un ANOVA de dos vías, siendo un factor la ovariectomía y el otro factor el estrés, para poder ver el efecto de cada factor individual y la interacción entre ambos. Posteriormente se realizó el test de Tukey para determinar diferencias entre grupos individuales. También se analizaron de esta forma todos los demás datos de estos experimentos.

En el test de NF se analizaron los siguientes parámetros: inmovilidad, natación, *climbing* y flotación (figura 10). En inmovilidad, parámetro que se toma como índice de comportamiento depresivo, se observaron efectos significativos del ECI ($p < 0,0001$) y de la ovariectomía ($p < 0,0001$), así como una fuerte interacción entre ambos factores ($p < 0,0001$). El análisis *post hoc* mostró que los grupos de ovariectomía de 2 semanas estresados (ovx2sE) y ovariectomía de 4 meses estresados (ovx4mE) eran significativamente diferentes de sus respectivos grupos no estresados (ovx2sNE y ovx4mNE), y también fueron diferentes de las hembras gonadalmente intactas y estresadas. Por otro lado no hubo diferencias entre las hembras intactas estresadas y las intactas no estresadas, por lo que se podría decir que los animales son sensibles al estrés sólo cuando tienen privación hormonal, sea de corta o larga duración, aunque este efecto es mucho más exagerado en los animales de ovariectomía de larga duración.

Respecto a la natación, también se observaron efectos de la ovariectomía y el ECI ($p < 0,05$) pero no interacción entre ambos. Tanto la ovx como el ECI tendieron a disminuir el comportamiento de natación, llegando a ser significativa esta diferencia en los grupos de estrés, así pues, ovx2sE y ovx4mE resultaron ser significativamente diferentes a las hembras intactas estresadas.

En la flotación sólo el efecto de la ovx fue estadísticamente significativo ($p = 0,0129$), pero se observó interacción estadísticamente significativa entre la ovx y el ECI ($p = 0,0017$). El ECI aumentó significativamente el tiempo de flotación en las hembras intactas estresadas frente a las intactas no estresadas mientras que lo disminuyó en ovx2sE

Resultados

y ovx4mE frente a sus respectivos grupos no estresados. Este efecto fue más pronunciado en ovx4mE, que resultó ser significativamente diferente de ovx2sE e intactas estresadas

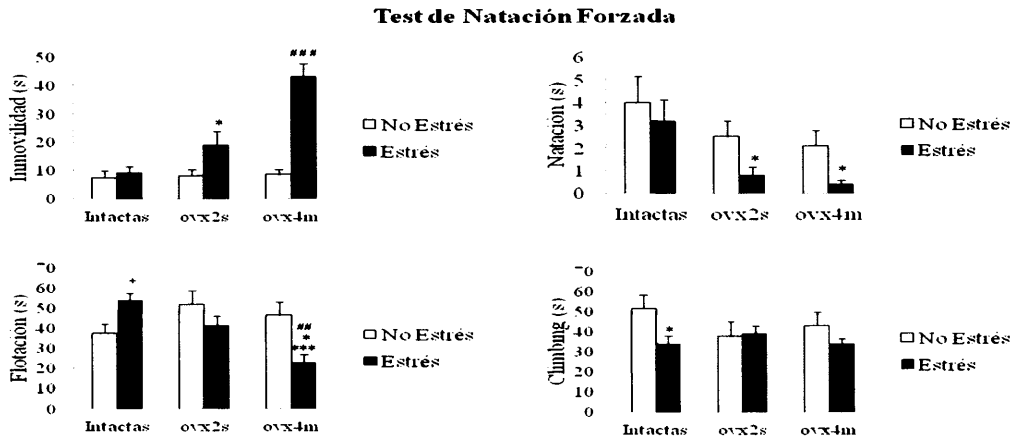


Figura 10: Resultados del test de natación forzada en ratones hembra gonadalmente intactos (Intactas) u ovariectomizados (ovx) y sometidos a estrés (E) o no (NE) 2 semanas (2s) o 4 meses (4m) después de la ovariectomía. Inmovilidad: ### $p < 0,001$ frente a los grupos ovx4NE, ovx2sE y hembras gonadalmente intactas y estresadas; * $p < 0,05$ frente a ovx2sNE y hembras intactas estresadas. Natación: * $p < 0,05$ frente a hembras intactas estresadas. Flotación: * $p < 0,05$ frente a ovx2sE; *** $p < 0,001$ frente a hembras intactas estresadas; ## $p < 0,01$ frente a ovx4mNE; + $p < 0,05$ frente a hembras intactas estresadas. Climbing: * $p < 0,05$ frente a hembras intactas estresadas

Finalmente, en el comportamiento de *climbing* solamente hubo un efecto estadísticamente significativo del ECI ($p = 0,023$). El análisis post hoc mostró que sólo hubo diferencia significativa entre intactas estresadas e intactas no estresadas, es decir, el ECI sólo afectó a este parámetro en el grupo de intactas.

Laberinto en cruz elevado

En el LCE (figura 11) el parámetro analizado fue el tiempo en brazos abiertos, que es un índice inversamente proporcional a la conducta de ansiedad, es decir a más tiempo en brazos abiertos menos ansiedad. El ANOVA mostró efectos significativos del ECI ($p < 0,05$) y la ovx ($p < 0,05$), pero no interacción entre ambos factores. Tanto el ECI como la ovx tendieron a disminuir el tiempo en brazos abiertos de una manera aditiva. El post hoc mostró que el grupo ovx4mNE es significativamente diferente de las hembras intactas no estresadas. Además el grupo ovx4mE es diferente del grupo ovx4mNE y también de las intactas estresadas.

Resultados

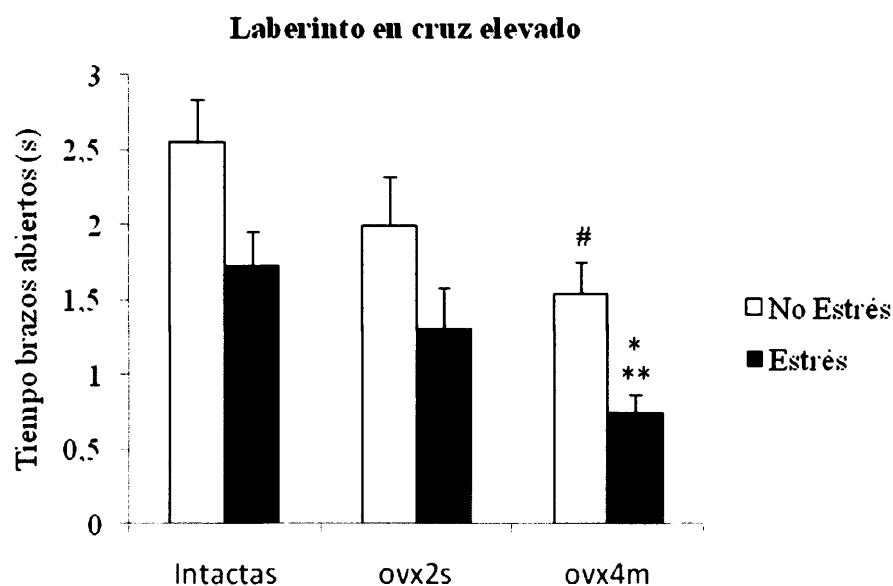


Figura 11: Resultados de la prueba del laberinto en cruz elevado en ratones hembra gonadalmente intactos (Int) u ovariectomizados (ovx) y sometidos a estrés (E) o no (NE) 2 semanas (2s) o 4 meses (4m) después de la ovariectomía. # $p < 0.05$ frente al grupo de hembras intactas (Int) no estresadas; * $p < 0.05$ vs ovx4m no estresadas; ** $p < 0.0001$ vs intactas estresadas.

Evolución de los pesos antes y después del ECI

Los ratones fueron pesados justo antes del inicio del protocolo de ECI y cuando este finalizó (figura 12). Se realizó un análisis de los pesos iniciales mediante un ANOVA de 1 vía, ya que el único factor en este caso era la ovariectomía. Se detectó un efecto significativo de la ovariectomía en el peso ($p < 0.001$), resultando tener mayor peso que los demás grupos el grupo ovx4m (figura 12).

Resultados

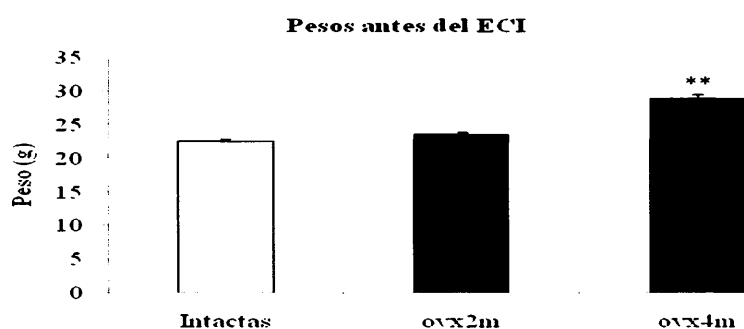


Figura 12: Pesos antes del ECI en ratones hembra gonadalmente intactos (Int) u ovariectomizados (ovx), 2 semanas (2s) o 4 meses (4m) después de la ovariectomía. ** $p < 0,01$ frente a ovx2s e intactas.

Tras el ECI los animales se pesaron de nuevo y se analizó la variación de peso respecto al peso inicial ($= [\text{Peso final} - \text{Peso inicial}] / \text{Peso inicial} \times 100$) por un ANOVA de dos vías. El análisis mostró un efecto de la ovariectomía ($p = 0,0012$) y un efecto del estrés que casi alcanzó la significancia estadística ($p = 0,0563$). El análisis post hoc demostró que el grupo ovx4mE sufrió una pérdida de peso considerable desde el inicio al final del ECI, siendo diferente significativamente de los demás grupos de estrés (intactas estresadas y ovx2sE) y de su correspondiente grupo sin estrés (ovx4mNE) (figura 13).

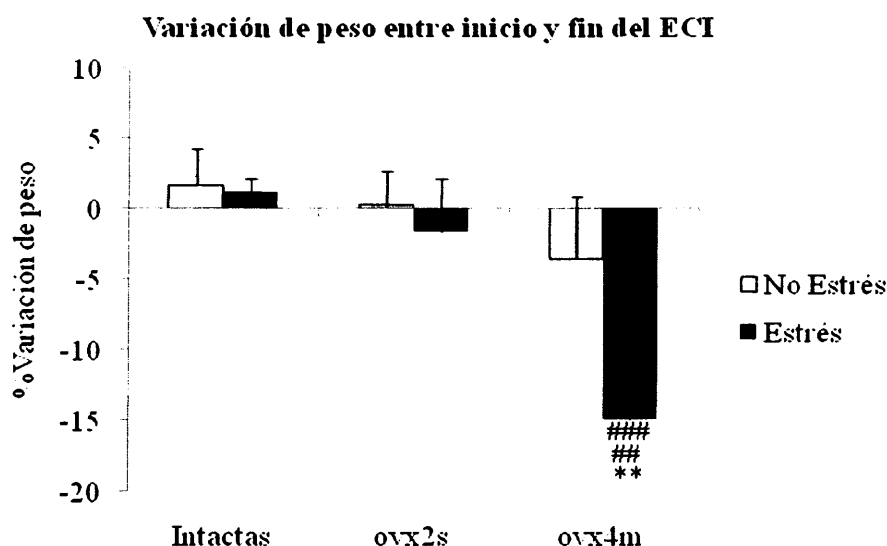


Figura 13: Variación en el peso entre el inicio y el fin del ECI en ratones hembra gonadalmente intactos (Int) u ovariectomizados (ovx) y sometidos a estrés (E) o no (NE) 2 semanas (2s) o 4 meses (4m) después de la ovariectomía.. ** $p < 0.01$ frente a ovx4mNE; ### $p < 0.001$ frente a intactas (Int) estresadas; ## $p < 0.01$ frente a ovx2sE.

Resultados

1.2. Efecto del estrés crónico y la privación hormonal sobre la conducta anhedónica.

Los datos obtenidos de este experimento (figura 14) fueron analizados mediante un ANOVA de 3 vías para medidas repetidas, siendo dos de los factores el ECI y la ovx, y el factor de medidas repetidas el tiempo, ya que se obtuvieron 4 medidas correspondientes a las 4 semanas de ECI. El análisis estadístico mostró un efecto del ECI ($p=0,0287$) y de la ovx ($p=0,0227$). Asimismo, la interacción entre la ovx y el tiempo resultó ser casi significativa (0,051). El análisis post hoc confirmó que el grupo de intactas estresadas, en la semana 3, tuvo una disminución estadísticamente significativa en el consumo de sacarosa en comparación con los demás grupos.

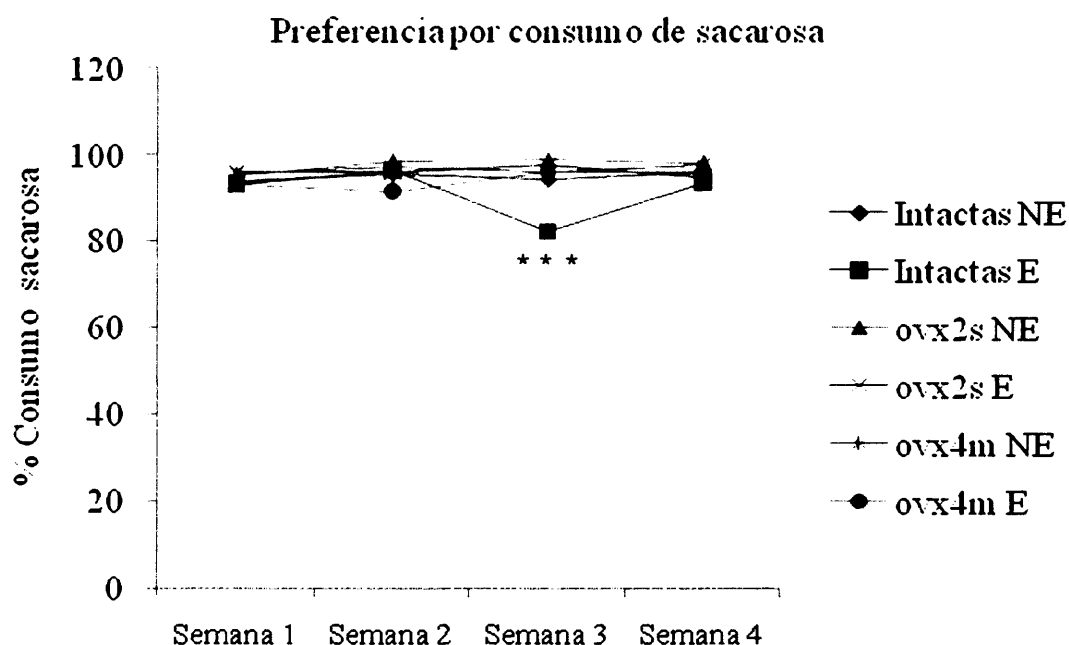


Figura 14: test de consumo de sacarosa o anhedonia en ratones hembra gonadalmente intactos (Intactas) u ovariectomizados (ovx) y sometidos a estrés (E) o no (NE) 2 semanas (2s) o 4 meses (4m) después de la ovariectomía. $p<0,0001$ grupo de intactas estresadas frente al resto de los grupos.

Resultados

1.3. Efecto del estrés crónico y la privación hormonal en las células de glía.

Para el análisis estadístico del número de células inmunoreactivas para GFAP, NG2, IBA-1 y BrdU, se aplicó siempre un ANOVA de 2 vías, siendo un factor el ECI y el otro factor la ovariectomía.

GFAP

En la figura 15 se pueden apreciar ejemplos del marcaje por GFAP, que es un marcador de astrocitos. Observamos un efecto estadísticamente significativo de la ovariectomía ($p=0,0114$), pero no del estrés, en el número de células inmunoreactivas para GFAP (figura 16). No se detectó una interacción significativa entre ovariectomía y estrés ($p=0,187$).

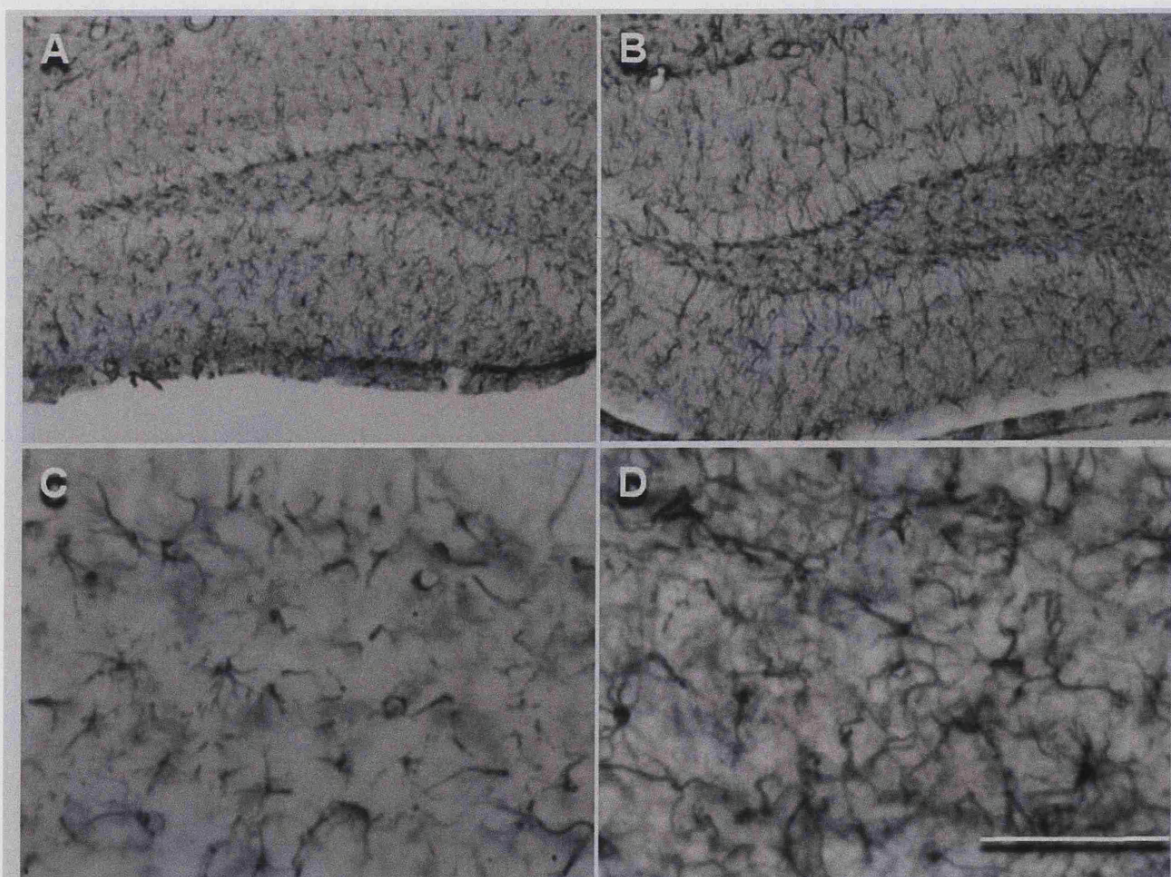


Figura 15: Células inmunorreactivas para GFAP en el hilus del giro dentado en los grupos de intactas no estrés (A y C) y en los grupos ovx4m estrés (B y D). La escala de la barra (esquina inferior derecha) es de 225 μm para A y B, y de 45 μm para C y D

Resultados

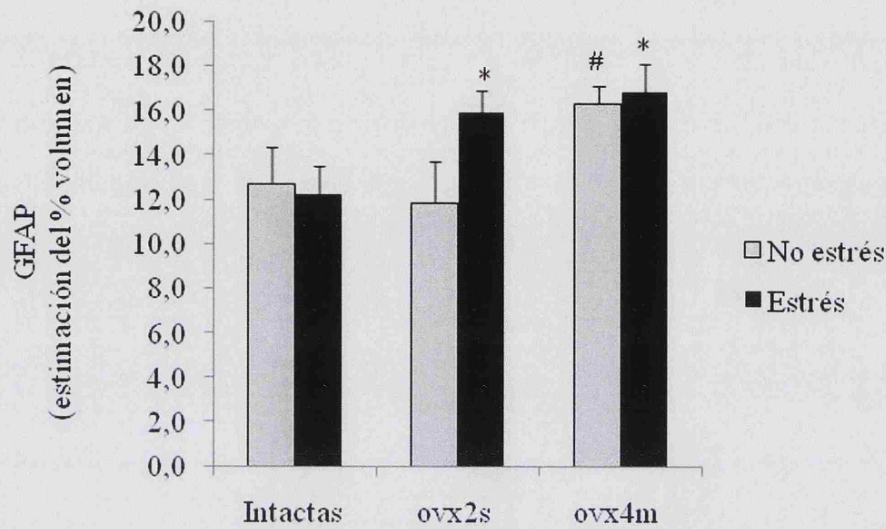


Figura 16: Número de células inmunoreactivas para GFAP en el hilus del giro dentado del hipocampo en ratones hembra gonadalmente intactos (Int) u ovariectomizados (ovx) y sometidos a estrés (E) o no (NE) 2 semanas (2s) o 4 meses (4m) después de la ovariectomía. * $p < 0.05$ vs intactas estresadas; # $p < 0.05$ vs ovx2s no estresadas

NG2

El NG2 constituye un marcador de precursores de oligodendrocitos. El marcaje característico se puede ver en la figura 17.

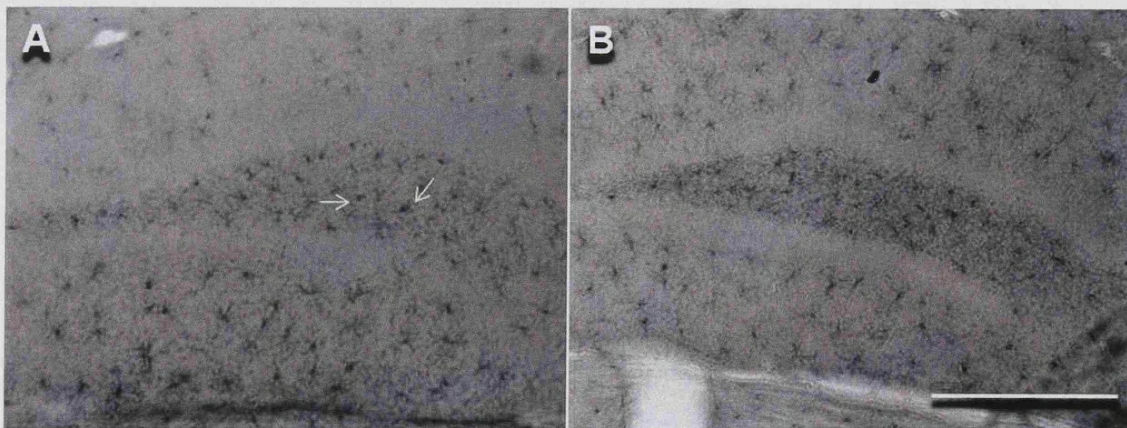


Figura 17: Células inmunorreactivas para NG2 en el hilus del giro dentado en los grupos de intactas no estrés (A) y ovx4m estrés (B). La escala de la barra (esquina inferior derecha) es de 225 μ m.

Resultados

Observamos un efecto estadísticamente significativo de la ovariectomía ($p<0,0001$), pero no del estrés, en el número de células inmunoreactivas para NG2 (figura 18). No se detectó una interacción entre la ovariectomía y el estrés. Así, todos los grupos de ratones ovx resultaron ser diferentes de las hembras gonadalmente intactas, independientemente de si habían sido estresadas o no (figura 10).

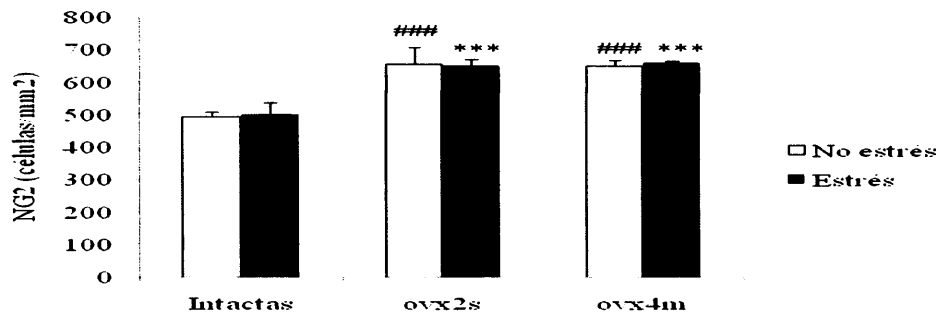


Figura 18: Número de células inmunoreactivas para NG2 en el hilus del giro dentado del hipocampo en ratones hembra gonadalmente intactos (Int) u ovariectomizados (ovx) y sometidos a estrés (E) o no (NE) 2 semanas (2s) o 4 meses (4m) después de la ovariectomía. ; ### $p<0,001$ vs intactas no estresadas ; *** $p<0,001$ vs intactas (Int) estresadas.

IBA-1

No detectamos ninguna diferencia significativa entre los grupos experimentales en el número de células inmunoreactivas para IBA-1, un marcador de microglía (figura 19).

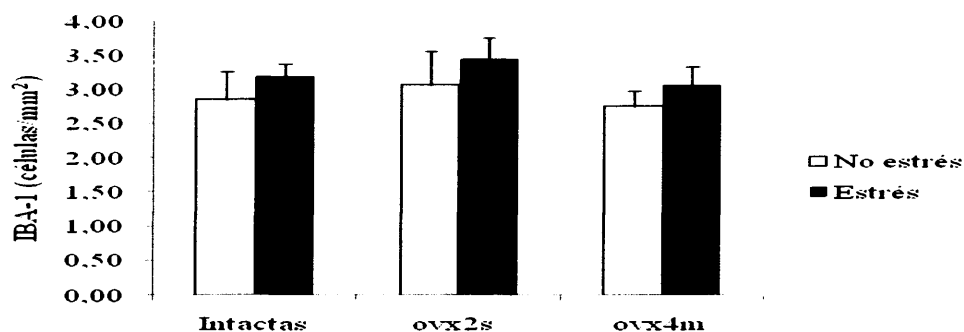


Figura 19: Número de células inmunoreactivas para IBA-1 en el hilus del giro dentado del hipocampo en ratones hembra gonadalmente intactos (Int) u ovariectomizados (ovx) y sometidos a estrés (E) o no (NE) 2 semanas (2s) o 4 meses (4m) después de la ovariectomía. No se observaron diferencias entre grupos.

Resultados

1.4. Efecto del estrés crónico y la privación hormonal en la proliferación celular en el giro dentado del hipocampo.

El número de células inmunoreactivas para BrdU se determinó en la zona subgranular y la capa granular del giro dentado del hipocampo (figura.20)

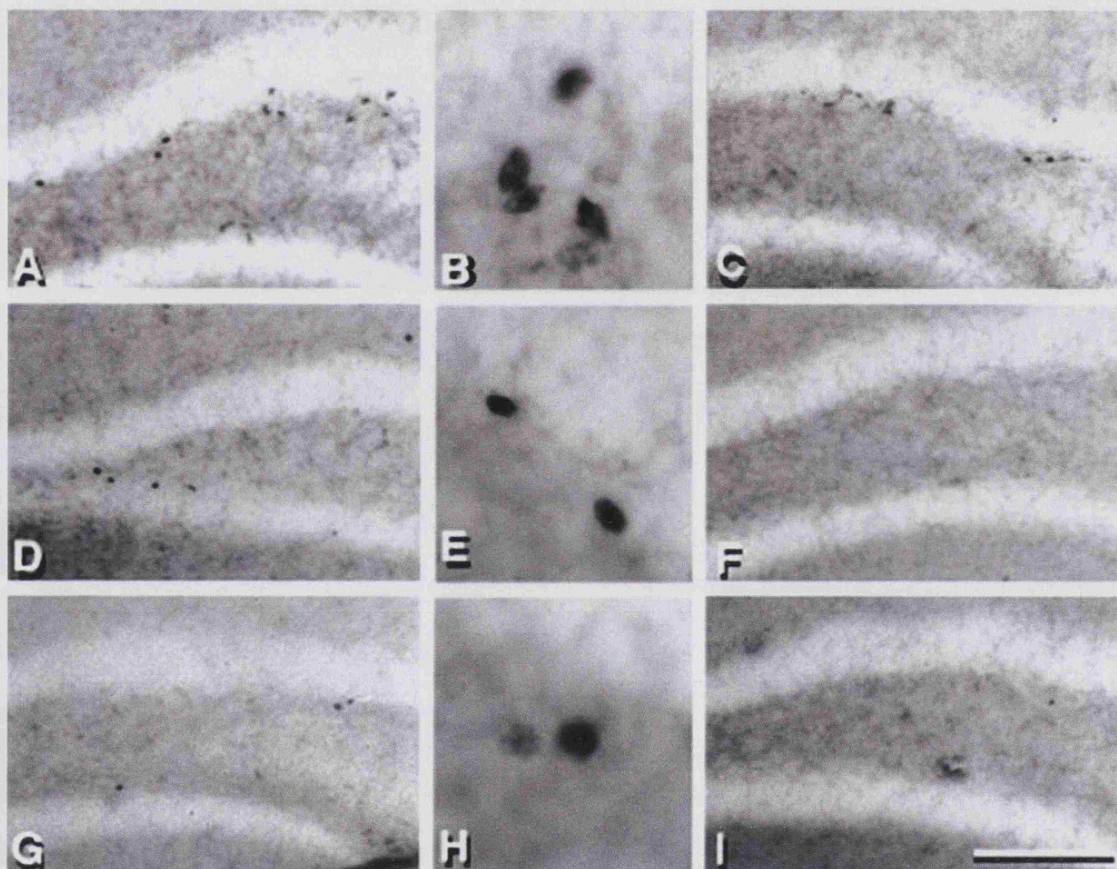


Figura 20: Células inmunorreactivas para BrdU en el giro dentado del hipocampo en ratones intactos sin estrés (A y B), ratones intactos sometidos a estrés (C), ratones ovariectomizados 2 semanas antes del inicio del experimento (D y E), ratones ovariectomizados 4 meses antes del inicio del experimento (F), ratones ovariectomizados 2 semanas antes del experimento y sometidos a estrés (G y H) y ratones ovariectomizados 4 meses antes del experimento y sometidos a estrés. La barra de escala corresponde a 225 μ m en fotos A, C, D, F, G e I y a 45 μ m en fotos B, E y H

El ANOVA mostró un efecto estadísticamente significativo de la ovariectomía ($p=0,0001$) pero no del ECI (figura 21). No se detectó una interacción entre ovariectomía y ECI.

Resultados

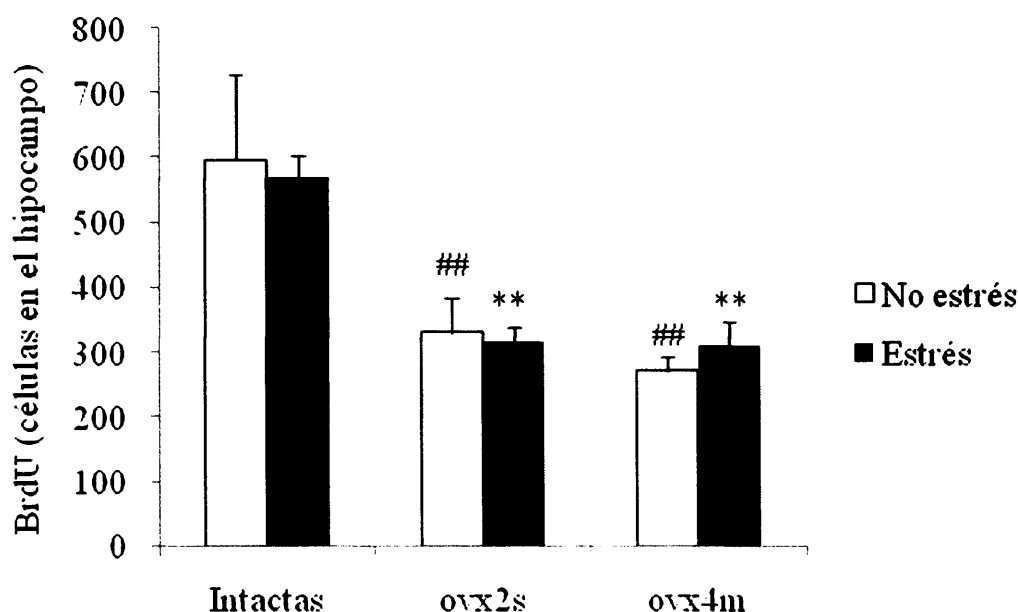


Figura 21: Estimación del número de células con marcaje BrdU en la zona subgranular y la capa granular del hipocampo en ratones hembra gonadalmente intactos (Int) u ovariectomizados (ovx) y sometidos a estrés (E) o no (NE) 2 semanas (2s) o 4 meses (4m) después de la ovariectomía. ## $p < 0,01$ vs intactas no estresadas; ** $p < 0,01$ vs intactas estresadas.

El análisis *post hoc* mostró que todos los grupos con ovariectomía, independientemente de si esta fue de corta o larga duración e independientemente del ECI, mostraban un menor número de células inmunoreactivas para BrdU.

1.5. Efecto de las hormonas ováricas y los SERMs sobre las conductas asociadas a ansiedad y depresión causadas por el estrés crónico y la privación hormonal.

Test de Natación Forzada

Como en el primer experimento de natación forzada, se cuantificaron y analizaron los comportamientos de inmovilidad, *climbing*, natación y flotación (figura 22) tomándose la inmovilidad como índice de comportamiento depresivo. El análisis estadístico aplicado fue un ANOVA de 1 vía (siendo la variable el grupo experimental) seguido de un análisis *post hoc* mediante el test de Tukey.

Resultados

Test de Natación Forzada

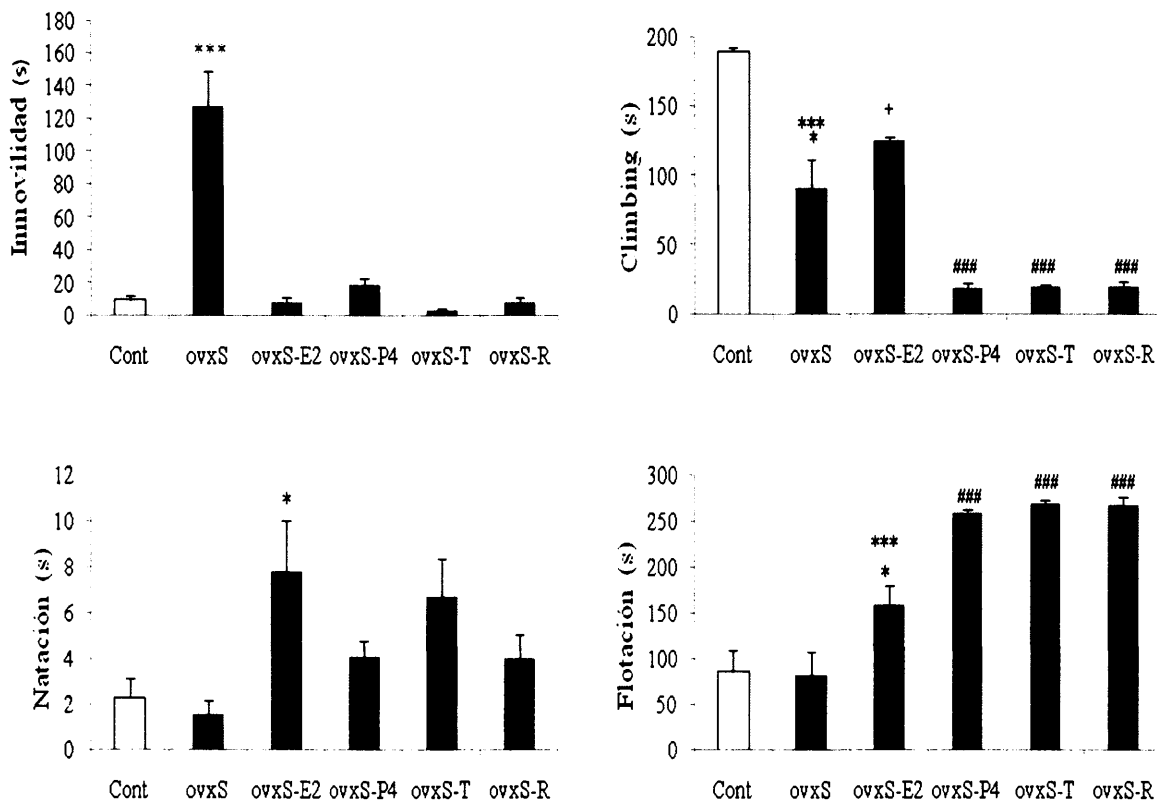


Figura 22: Resultados del test de natación forzada en ratones hembra gonadalmente intactos y no estresados (Cont), ovariectomizados y estresados (ovxS), ovariectomizados, estresados e inyectados con estradiol (ovxS-E2), ovariectomizados, estresados e inyectados con progesterona (ovxS-P4), ovariectomizados, estresados e inyectados con tamoxifeno (ovxS-T) y ovariectomizados, estresados e inyectados con raloxifeno (ovxS-R). Inmovilidad: * $p < 0,001$ frente a todos los otros grupos. Climbing: * $p < 0,05$ frente a los animales ovariectomizados, estresados y tratados con progesterona (ovxS-P4), tamoxifeno (ovxS-T) y raloxifeno (ovxS-R); *** $p < 0,001$ frente al grupo control, formado por animales no estresados y gonadalmente intactos (Cont); + $p < 0,05$ frente al grupo control; ### $p < 0,001$ frente al grupo control y al grupo de animales ovariectomizados, estresados y tratados con estradiol (ovxS-E2). Natación: * $p < 0,05$ frente al grupo control y a los animales ovariectomizados, estresados e inyectados con vehículo (ovxS). Flotación: * $p < 0,05$ frente al grupo control y al grupo ovxS; *** $p < 0,001$ frente a ovxS-P4, ovxS-T y ovxS-R; ### $p < 0,001$ frente a los grupos control, ovxS y ovxS-E**

En la inmovilidad, el ANOVA mostró una diferencia significativa entre el grupo de animales ovariectomizados, estresados e inyectados con vehículo (ovxS) respecto a todos

Resultados

los demás grupos ($p < 0,001$). Todos los demás grupos resultaron tener valores similares de inmovilidad. Es decir, todos los grupos con tratamientos se comportaron de la misma forma que el grupo control (hembras gonadalmente intactas).

En el *climbing* también se observó un fuerte efecto del grupo ($p < 0,001$). El grupo ovxS mostró menor tiempo de *climbing* comparado con el grupo control y con el grupo de animales ovariectomizados, estresados y tratados con estradiol (ovxS-E2). El grupo ovxS-E2 por otro lado, tuvo un tiempo de *climbing* menor que el control. Por último, los grupos de animales ovariectomizados, estresados e inyectados con progesterona (ovxS-P4), tamoxifeno (ovxS-T) y raloxifeno (ovxS-R) mostraron niveles de *climbing* muy inferiores a los grupos ovxS-E2, ovxS y control.

Para el tiempo de natación se detectó un efecto significativo de grupo ($p = 0,010$), viéndose en el análisis post hoc que esta diferencia correspondía principalmente al grupo ovxS-E2, con los mayores niveles de natación, que llegaron a ser estadísticamente significativos frente a los grupos control y ovxS.

Por último, en el tiempo de flotación también se observó un efecto significativo ($p < 0,001$). Este efecto correspondió a diferencias de los grupos tratados con estradiol, progesterona, tamoxifeno o raloxifeno, ya que tanto el grupo control, como el grupo ovxS mostraron un tiempo de natación similar, pero el grupo ovxS-E2 y en mayor medida los grupos ovxS-P4, ovxS-T y ovxS-R, mostraron altos tiempos de flotación.

Laberinto en cruz elevado

En esta prueba también observamos un efecto de grupo ($p < 0,001$). El grupo ovxS mostró una disminución estadísticamente significativa en el tiempo en brazos abiertos comparado con el grupo control. En los grupos tratados con estradiol, progesterona, tamoxifeno o raloxifeno el tiempo en brazos abiertos aumentó, llegando a ser estadísticamente diferente del grupo ovxS y no mostrando ninguna diferencia con el grupo control. En concreto, los grupos ovxS-E2 y ovxS-R mostraron un tiempo en brazos abiertos muy similar al del grupo control (figura 23).

Resultados

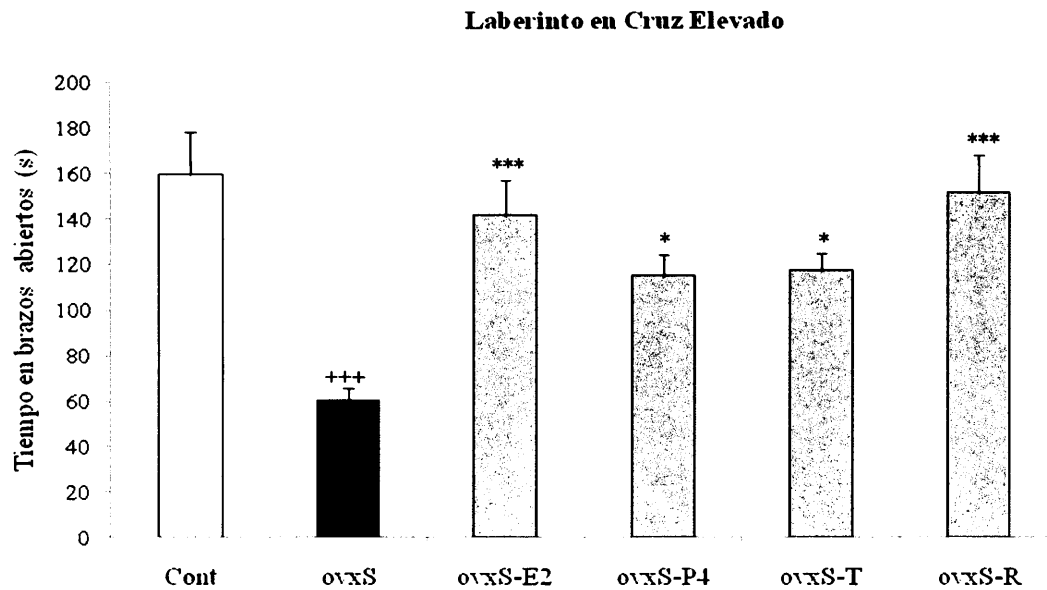


Figura 23: Tiempo en brazos abiertos en el LCE en ratones hembra gonadalmente intactos y no estresados (Cont), ovariectomizados y estresados (ovxS), ovariectomizados, estresados e inyectados con estradiol (ovxS-E2), ovariectomizados, estresados e inyectados con progesterona (ovxS-P4), ovariectomizados, estresados e inyectados con tamoxifeno (ovxS-T) y ovariectomizados, estresados e inyectados con raloxifeno (ovxS-R). +++ $p < 0.001$ frente al grupo control; * $p < 0.05$ y *** $p < 0.001$ frente al grupo ovxS.

2. LPS prenatal

2.1. Efecto del LPS prenatal sobre la señalización por IGF-1 y los receptores de estrógeno.

En este bloque de experimentos se analizaron los niveles de proteínas relevantes en la ruta de IGF-1: el receptor de IGF-1 (IGF-1R), la Akt total y la fosforilada en la serina 474 (P-Akt), la GSK3 total y la fosforilada en la serina-9 (p-GSK3), y las ERK1, ERK2 totales y fosforiladas (p-ERK1 y p-ERK2). Asimismo, se analizaron los niveles de los receptores de estrógenos alfa y beta ($ER\alpha$ y $ER\beta$) debido a la relevancia de estos en la activación de la vía de IGF-1. Las zonas analizadas del cerebro fueron el hipocampo, la corteza prefrontal, el hipotálamo y el cerebelo.

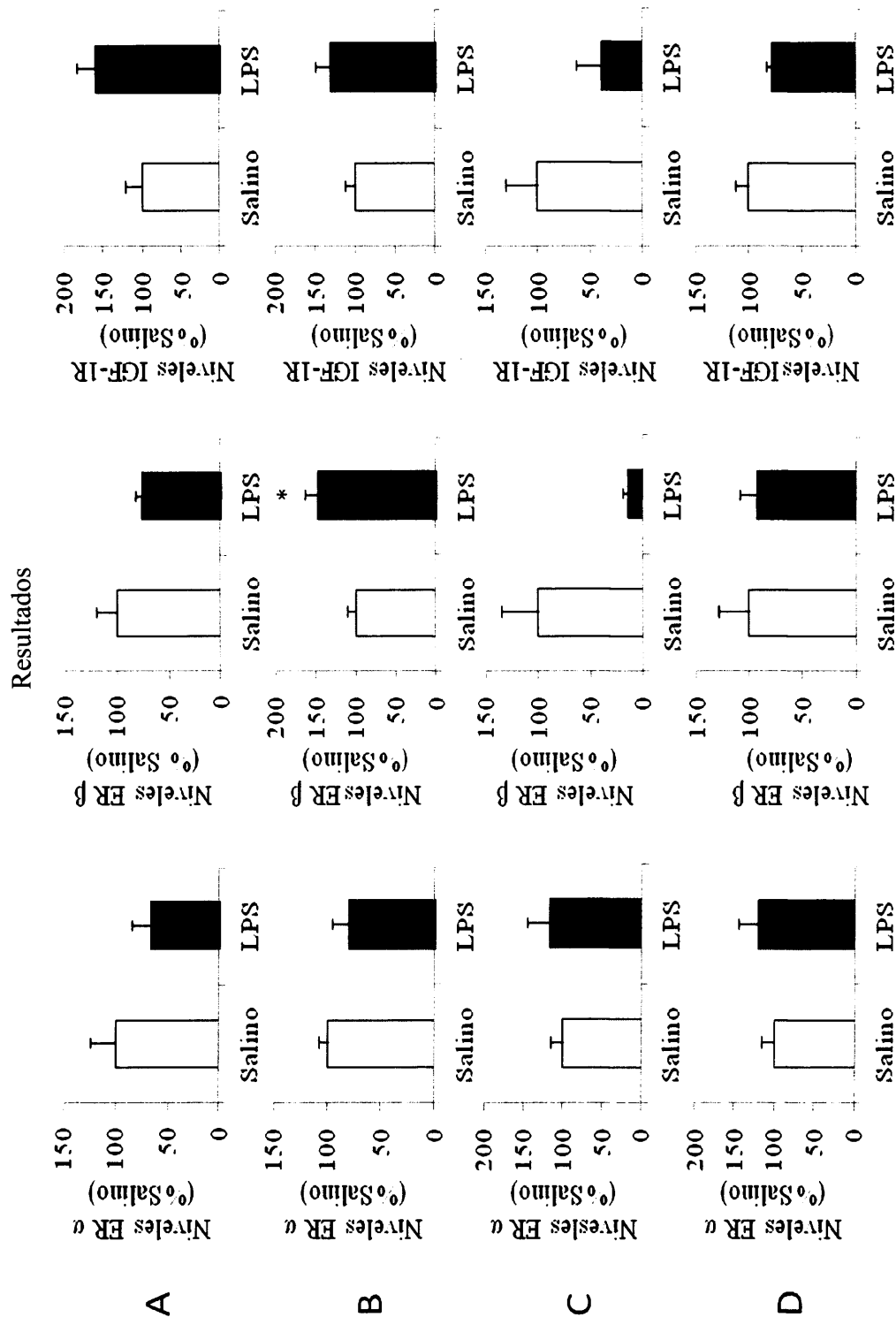


Figura 24: Niveles del receptor de IGF-1 y de los receptores de estrógeno α y β en hipocampo (A), corteza prefrontal (B), hipotálamo (C) y cerebelo (D) en animales tratados con LPS o vehículo (Salino). * $p < 0.05$ respecto al grupo control.

Resultados

Receptor de IGF-1 y receptores de estrógeno

En general no se encontraron cambios en los niveles de los receptores de IGF-1 y estrógenos (figura 24). La excepción fue la corteza prefrontal, en la que los animales tratados con LPS mostraron mayores cantidades de ER β que los animales tratados con vehículo ($p=0,03$). En el caso del hipocampo se observó una tendencia no significativa al aumento del receptor de IGF-1 en ratas tratadas con LPS prenatal ($p=0,097$). Respecto al hipotálamo se observó una tendencia casi significativa al aumento en los niveles de ER β en ratas tratadas prenatalmente con LPS ($p=0,058$).

GSK3 y Akt

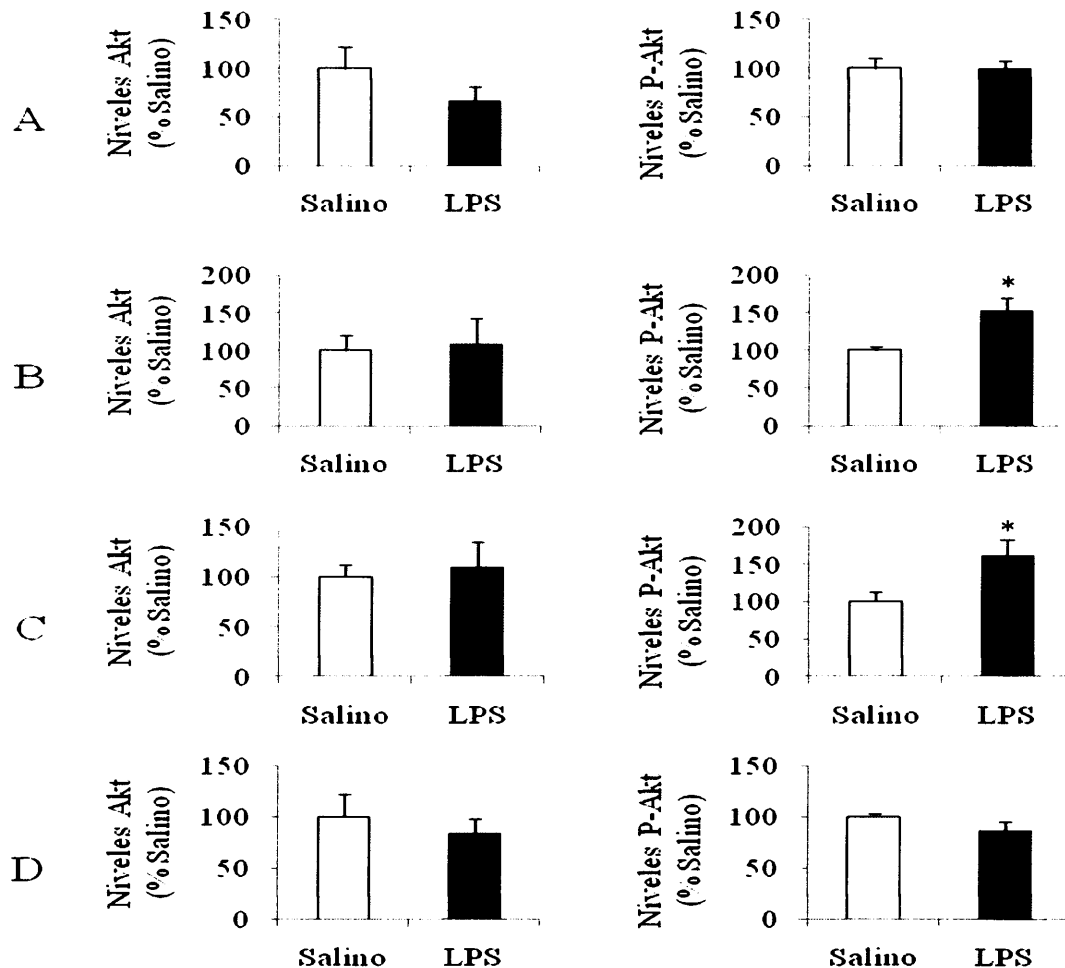


Figura 25: Niveles de Akt total (Akt) y de Akt fosforilada (P-Akt) en hipocampo (A), corteza prefrontal (B), hipotálamo (D) y cerebelo (E) en animales tratados con LPS o vehículo (Salino). * $p < 0,05$ frente al grupo control.

Resultados

En Akt total no hubo diferencias en ninguno de los tejidos estudiados. Sin embargo, tanto en corteza prefrontal como en el hipotálamo, los niveles de P-Akt fueron significativamente mayores en el grupo de animales tratados con LPS (figura 25).

Respecto a los niveles de GSK3 y de su correspondiente forma inactiva fosforilada, p-GSK3 (figura 26), no hubo ningún cambio en el hipocampo ni en la corteza. En el hipotálamo se apreció una disminución significativa en GSK3 en las ratas tratadas con LPS ($p=0,039$). Asimismo, en el cerebelo, los animales tratados con LPS presentaron menores niveles de GSK3 total ($p=0.003$) y de p-GSK3 ($p<0.001$).

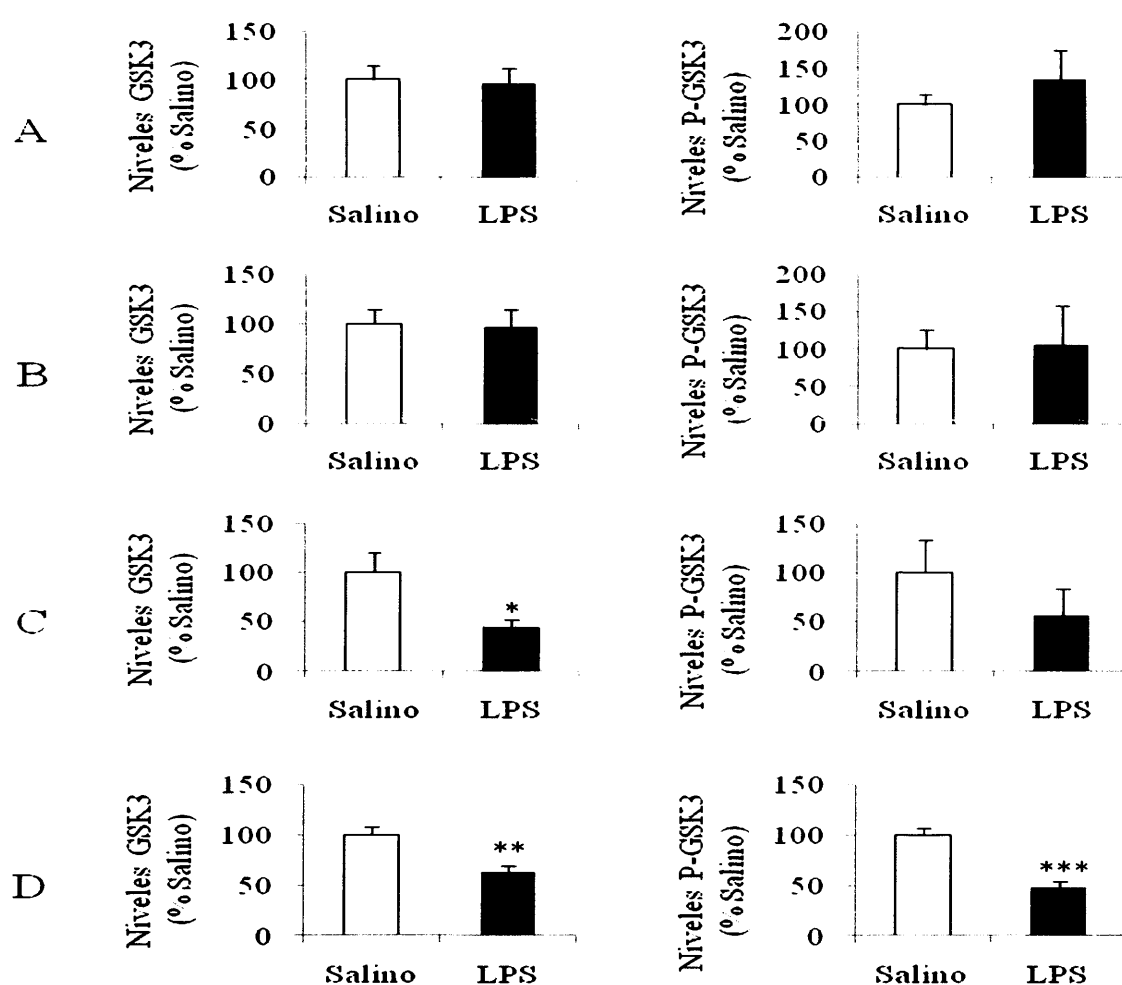


Figura 26: Niveles de GSK3 total (GSK3) y de GSK3 fosforilada (p-GSK3) en hipocampo (A), corteza prefrontal (B), hipotálamo (D) y cerebelo (E) en animales tratados con LPS o vehículo (Control). * $p < 0,05$ frente al grupo control; ** $p < 0,01$ frente al grupo control; *** $p < 0,001$ frente al grupo control.

Resultados

ERK 1/2

Por último, cuantificamos los niveles de ERK 1 y 2 y de sus versiones fosforiladas p-ERK1 y p-ERK2. No se detectaron diferencias significativas salvo en el cerebelo, que mostró un aumento en los niveles de ERK1 total y una disminución en los niveles de p-ERK1 en los animales tratados con LPS (figuras 27 y 28)

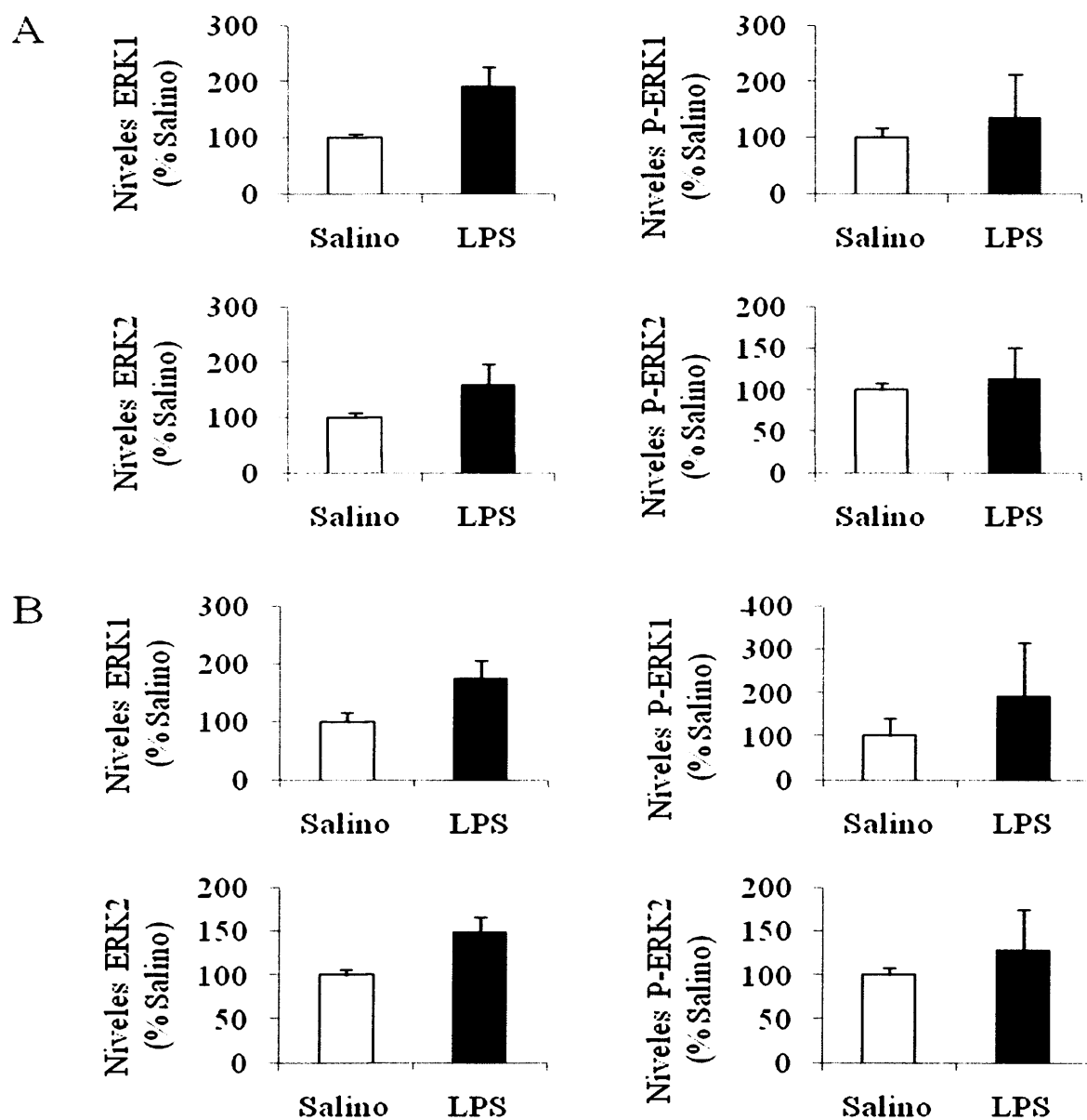


Figura 27: Niveles de ERK1/2 y de ERK1/2 fosforiladas (P-ERK1/2) en hipocampo (A), corteza prefrontal (B).

Resultados

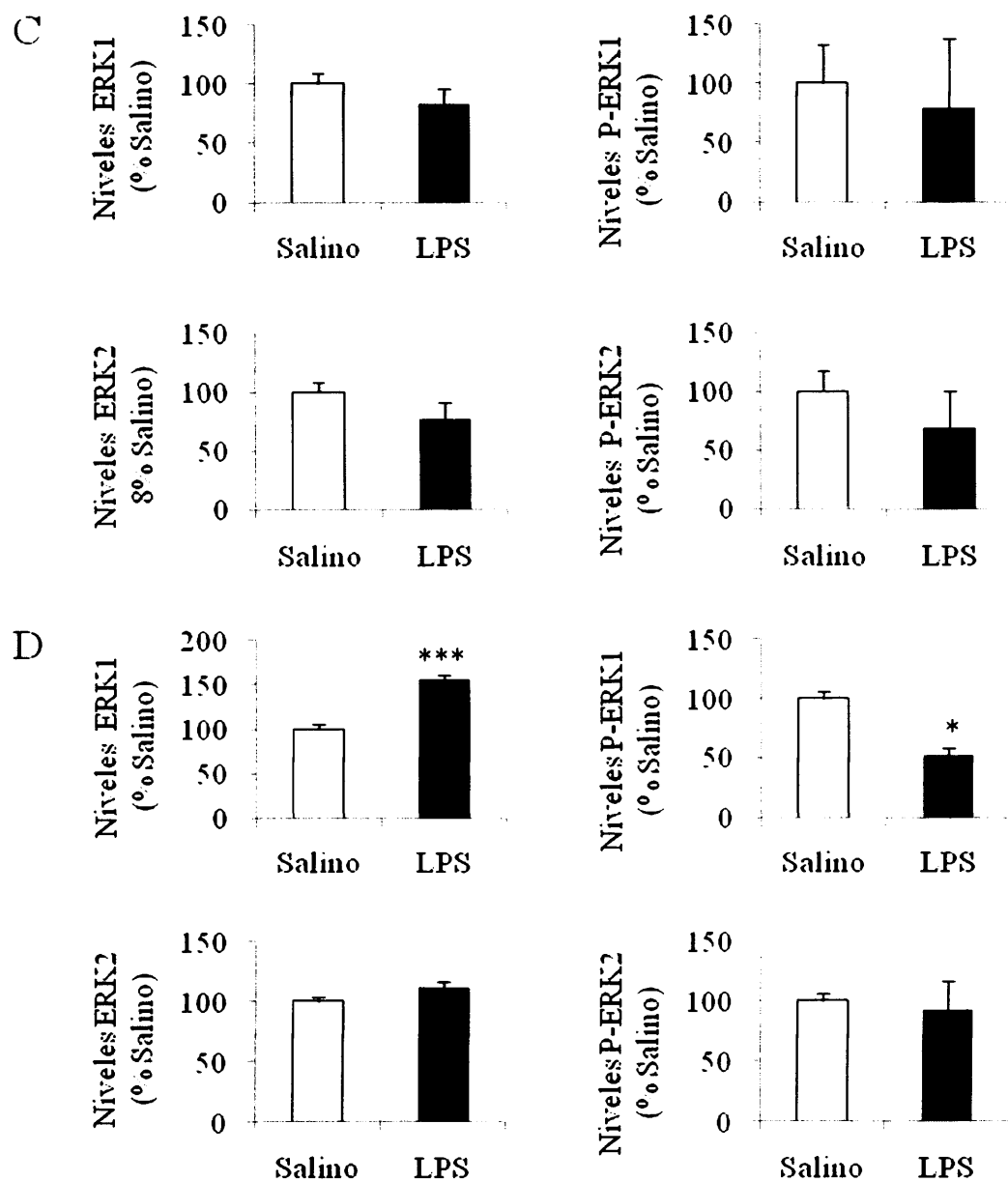


Figura 28: Niveles de ERK1/2 y de ERK1/2 fosforiladas (p-ERK1/2) en hipotálamo (C) y cerebelo (D) en animales tratados con LPS o vehículo (Control). * $p < 0,05$ frente al grupo control; *** $p < 0,001$ frente al grupo control.

Resultados

2.2. Efecto del LPS prenatal, dimorfismo sexual y privación hormonal en el reconocimiento de objetos.

En este experimento quisimos comprobar si las ratas tratadas prenatalmente con LPS presentaban algún déficit en el test de reconocimiento de objetos, que constituye una prueba aceptada para estudiar déficits cognitivos en modelos de esquizofrenia. Se realizó el test tanto en machos como en hembras, para comprobar si existía algún tipo de diferencia sexual. Para evaluar el efecto de la privación hormonal, se realizó el test también en ratas castradas de ambos sexos.

Efecto del LPS prenatal en machos y hembras

En las ratas macho (figura 29), el test de RO reveló un déficit en el reconocimiento de objetos en los animales tratados con LPS, que tuvieron un ID sensiblemente más bajo que los tratados con vehículo ($p<0,0001$). Esta diferencia no es atribuible a diferencias en tiempos de exploración, ya que en estos parámetros no hubo ningún cambio. Sin embargo, las ratas macho del grupo LPS mostraron una actividad locomotora significativamente menor que las del grupo control ($p=0,0129$).

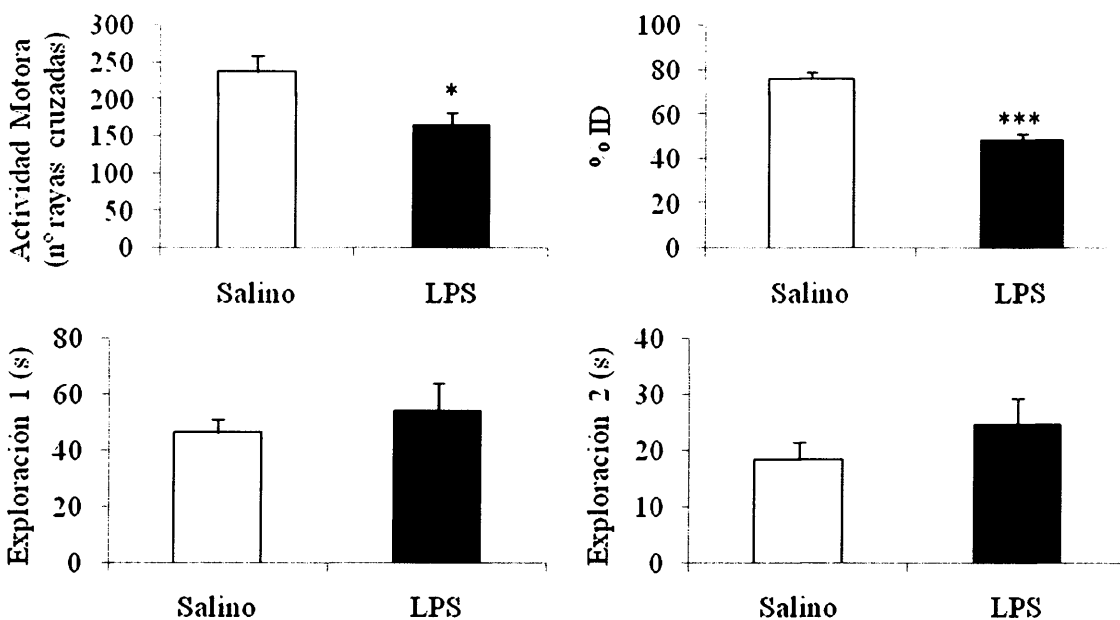


Figura 29: Reconocimiento de objetos en ratas macho tratadas prenatalmente con LPS o vehículo (Salino). * $p<0,05$ frente al grupo control; *** $p<0,001$ frente al grupo control.

Resultados

En el caso de las hembras (figura 30), no se observó ninguna diferencia entre los grupos LPS y vehículo en ninguno de los parámetros estudiados, observándose así un dimorfismo sexual en el efecto del LPS prenatal en esta tarea.

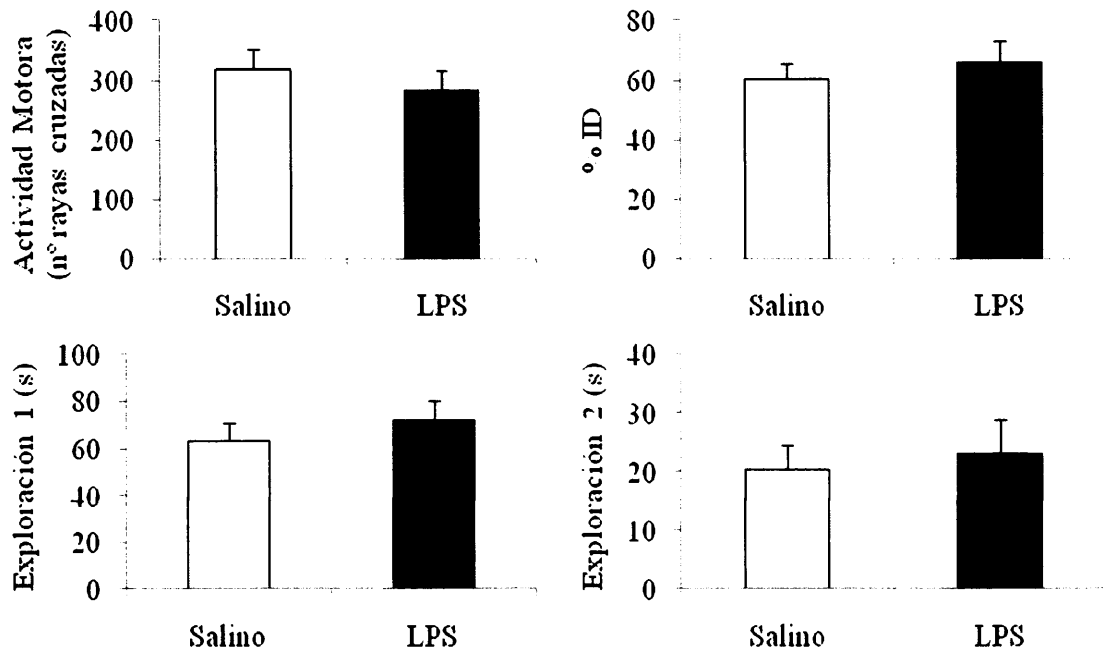


Figura 30: Reconocimiento de objetos en ratas hembra tratadas prenatalmente con LPS o vehículo (Salino).

Comparando machos y hembras (figura 31), y analizando los parámetros LPS prenatal y sexo, descubrimos un efecto significativo del LPS prenatal ($p=0.0126$) y una interacción altamente significativa entre el LPS prenatal y el sexo ($p=0.0004$) en el índice de reconocimiento (ID). En ratas tratadas prenatalmente con salino, los machos tuvieron un índice de reconocimiento mayor que las hembras, sin embargo en animales con tratados con LPS prenatal, las hembras LPS, que no se diferenciaron de las hembras Salino, mostraron un índice de reconocimiento mayor que el de los machos. A su vez, los machos LPS mostraron una disminución en el ID comparado con los machos Salino.

También en la actividad locomotora se observó un efecto del LPS prenatal ($p=0.0396$) y del sexo ($p=0.0002$). Las hembras mostraron en todos los casos mayor actividad que los machos, y no hubo diferencias entre hembras tratadas prenatalmente con salino y hembras tratadas prenatalmente con LPS. En los machos, los tratados

Resultados

prenatalmente con LPS mostraron menor actividad locomotora que los machos tratados prenatalmente con salino. No se encontraron diferencias en los tiempos de exploración.

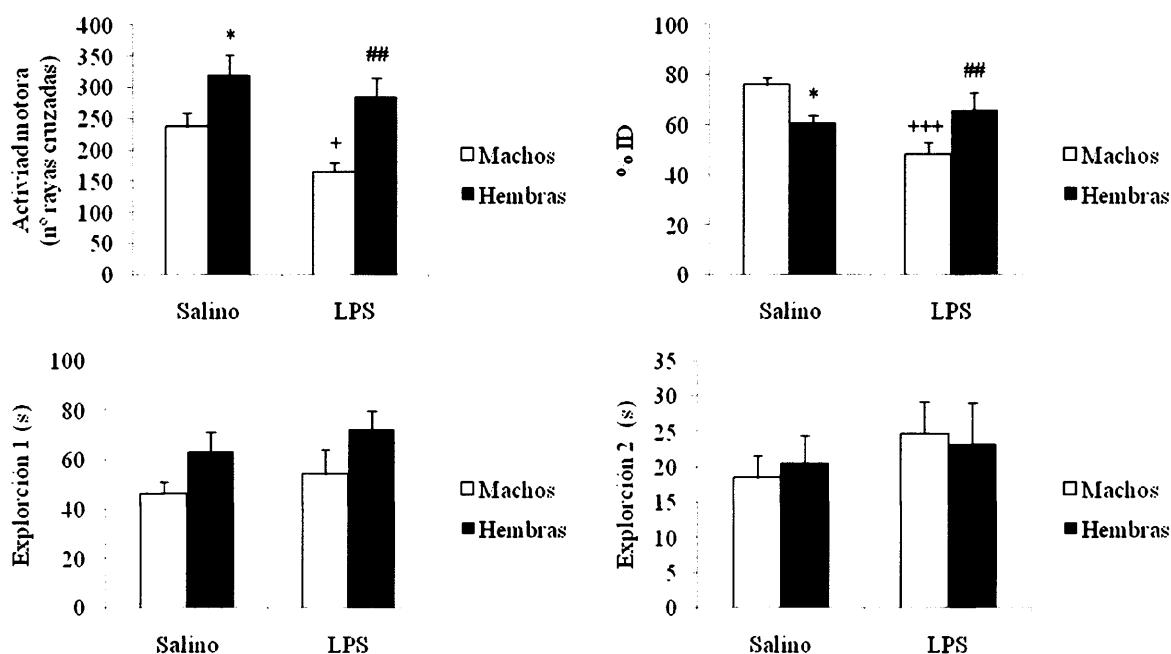


Figura 31: Reconocimiento de objetos en ratas macho y hembra tratadas prenatalmente con vehículo (Salino) o LPS. Actividad Motora. * $p < 0.05$ Hembras Salino frente a Machos Salino; + $p < 0.05$ Machos LPS frente a Machos Salino; ## $p < 0.01$ Hembras LPS frente a Machos LPS. **ID.** * $p < 0.05$ Hembras Salino frente a Machos Salino; +++ $p < 0.001$ Machos LPS frente a Machos Salino; ## $p < 0.01$ Hembras LPS frente a Machos LPS. **Exploración 1 y 2.** No se encontraron diferencias

Efecto de la privación hormonal e interacción con el LPS prenatal

Nos planteamos que una posible causa del dimorfismo sexual fuera que las hembras del grupo LPS estuvieran protegidas por el estradiol y/o la progesterona frente a déficits cognitivos. Para evaluar esa hipótesis, se repitió el test en hembras de los grupos control y LPS que fueron ovariectomizadas para comprobar si la disminución en los niveles de estas hormonas debido a la castración inducía algún déficit en el test de reconocimiento de objetos. Asimismo, otra posibilidad es que fuera la testosterona en machos lo que estuviera induciendo el déficit en las ratas macho del grupo LPS, por lo que también se realizó el test en ratas macho castradas de ambos grupos. Los resultados se analizaron por un ANOVA

Resultados

de dos vías, para evaluar el papel de la gonadectomía y el LPS prenatal por separado, así como posibles interacciones entre ambos.

En el experimento con ratas macho (figura 32), se observó de nuevo un efecto del LPS prenatal ($p=0,0363$), mostrando las ratas del grupo LPS gonadalmente intactas un ID menor que las controles intactas. El ANOVA no mostró un efecto significativo de la orquidectomía (okx), pero se detectó una disminución en el ID de las ratas del grupo salino okx comparadas con las del grupo salino intactas

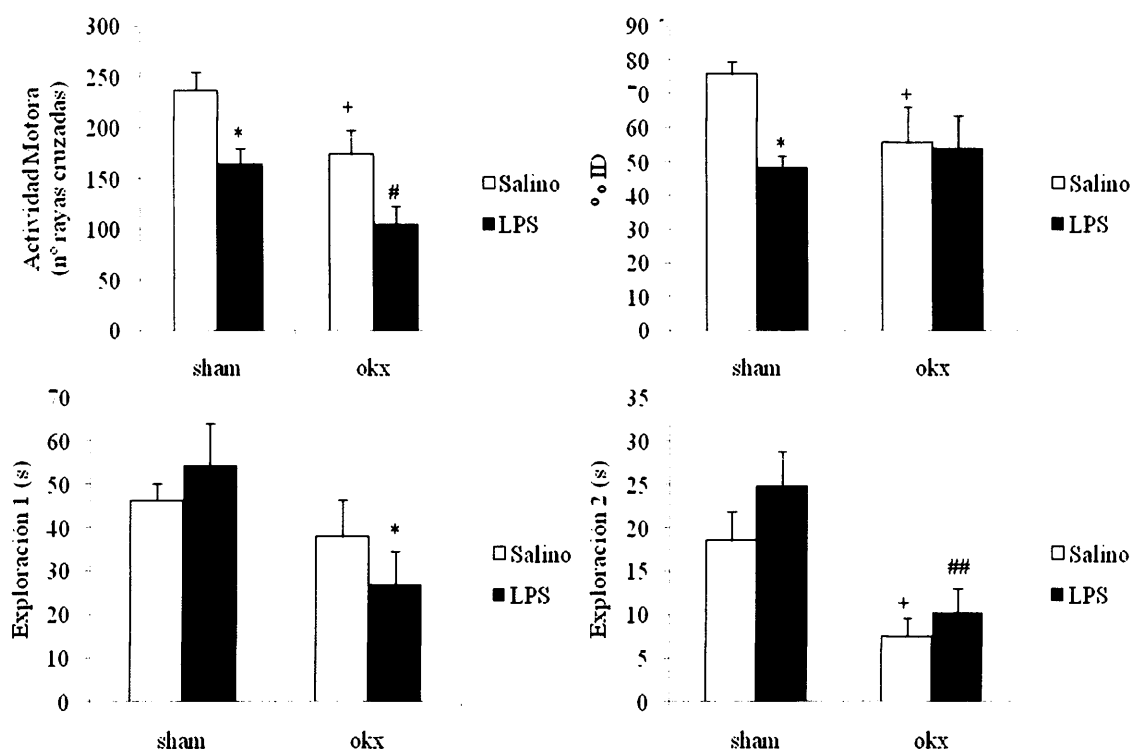


Figura 32: Reconocimiento de objetos en ratas macho orquidectomizadas (okx o gonadalmente intactas (sham) y tratadas prenatalmente con vehículo (salino) o LPS. **Actividad Motora:** Se observaron efectos aditivos de la orquidectomía ($p=0,0006$) y del LPS prenatal ($p=0,0025$) sin interacción entre ambos. * $p<0,05$ LPS-Sham frente a Sal-Sham ; + $p<0,05$ Sal-okx frente a Sal-Sham; # $p<0,05$ LPS- okx frente a Sal-okx y LPS-Sham . **Exploración 1:** El tiempo de exploración en la primera fase del test se vio afectado por la orquidectomía ($p=0,0218$). * $p<0,05$ LPS-OKX frente a LPS-Sham. **ID:** El LPS prenatal mostró un efecto significativo en el ID ($p=0,0363$). * $p<0,05$ LPS-Sham frente a Sal-Sham; + $p<0,05$ Sal- okx frente a Sal-Sham. **Exploración 2:** la orquidectomía disminuyó significativamente el tiempo de exploración en la segunda fase en ambos grupos, Sal y LPS ($p=0,0002$). + $p<0,05$ Sal- okx frente a Sal-Sham; ## $p<0,01$ LPS-okx frente a LPS-Sham.

Resultados

La actividad motora se vio afectada por ambos factores, LPS prenatal ($p=0,0025$) y orquidectomía ($p=0,0006$). Estos efectos fueron independientes el uno del otro, es decir no hubo interacción entre ambos factores. El análisis *post hoc* mostró que seguía existiendo una disminución en actividad motora en los animales tratados prenatalmente con LPS-Respecto a los tratados con vehículo, tanto en los sham como en los orquidectomizados. A su vez, los animales orquidectomizados mostraron una menor actividad motora respecto a sus correspondientes grupos sham.

Los tiempos de exploración también disminuyeron en los animales orquidectomizados. En la primera fase se observó un efecto significativo de la orquidectomía ($p=0,0218$). El análisis *post hoc* mostró que esta diferencia llegó a ser significativa en animales del grupo LPS-orquidectomía respecto al grupo LPS-sham. En el tiempo de exploración en la segunda fase, este efecto fue incluso más prominente ($p=0,0002$), observándose una marcada disminución en la exploración en el grupo vehículo-orquidectomía y LPS-orquidectomía respecto a sus correspondientes grupos sham.

En el caso de las hembras (figura 33) no se observó ningún efecto del LPS prenatal ni de la ovariectomía en el ID. La privación hormonal disminuyó la actividad locomotora ($p=0,0023$) de forma que el grupo ovariectomizado y tratado prenatalmente con vehículo resultó tener niveles significativamente. más bajos de esta que el grupo sham tratado prenatalmente con vehículo. El grupo con LPS prenatal y ovariectomizadas, también mostró menor actividad locomotora que LPS sham, aunque en el análisis *post hoc*, esta diferencia no llegó a ser estadísticamente significativa.

También la ovariectomía disminuyó los tiempos de exploración en la fase 1 ($p<0,0001$) y en la fase 2 ($p=0,0301$) respecto a las ratas sham. En el análisis *post hoc*, esta diferencia llegó a ser significativa en el tiempo de exploración 1 en las ratas ovx tratadas con vehículo o LPS-Respecto a sus respectivos grupos sham.

Resultados

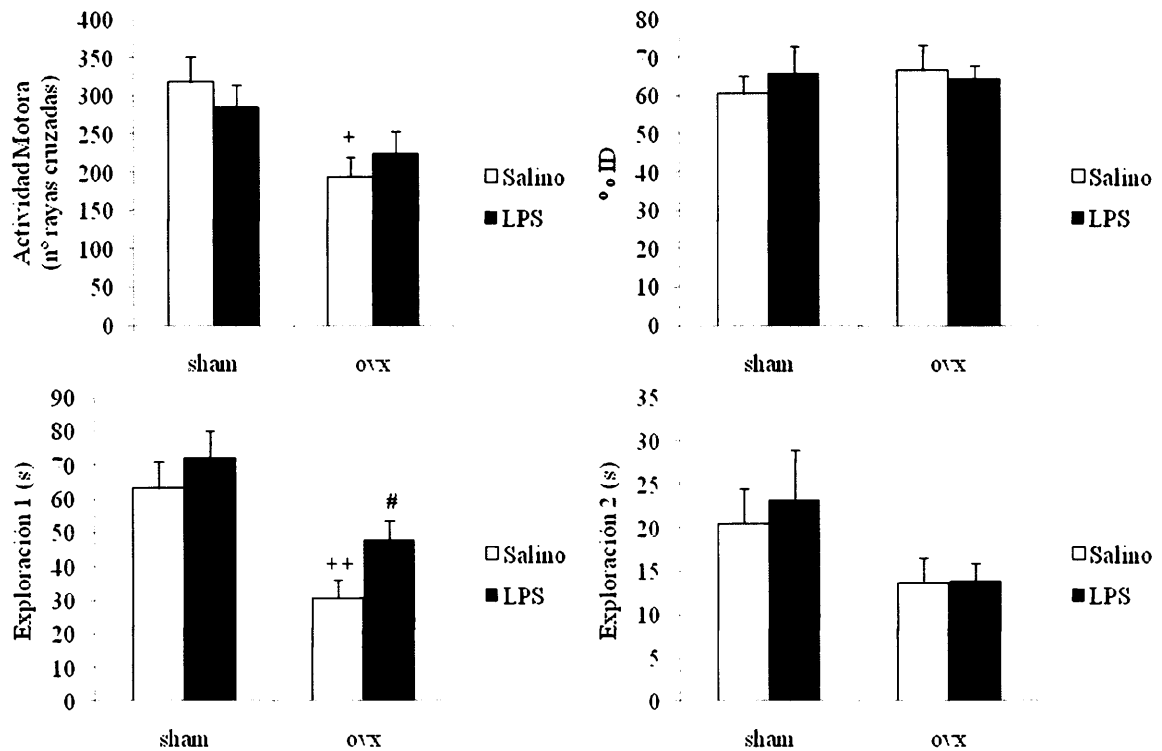


Figura 33: Reconocimiento de objetos en ratas hembra ovariectomizadas (OVX) o gonadalmente intactas (Sham) y tratadas prenatalmente con vehículo (Sal) o LPS. **Actividad Motora:** La ovariectomía mostró un efecto significativo ($p=0,0023$); + $p<0,05$ Sal-ovx frente a Sal-Sham. **Exploración 1:** La ovariectomía mostró un efecto significativo ($p<0,0001$); ++ $p<0,01$ frente a Sal-Sham; # $p<0,05$ frente a LPS-Sham. **ID:** No se observó ningún efecto de la ovariectomía, del LPS prenatal ni una interacción entre ambos factores. **Exploración 2:** Se detectó un efecto significativo de la ovariectomía ($p=0,0301$).

2.3. Efecto de las hormonas ováricas y los SERMs en el reconocimiento de objetos

En este último experimento, nos planteamos si en las ratas macho, con un tratamiento agudo con estradiol (E2), progesterona (P4), tamoxifeno (T) o raloxifeno (R) podría recuperarse el desempeño normal en el test de reconocimiento de objetos. Los resultados del análisis estadístico (por ANOVA de 1 vía) sugirieron que ese podría ser el caso, aunque con algunos matices a considerar (figura 34).

Resultados

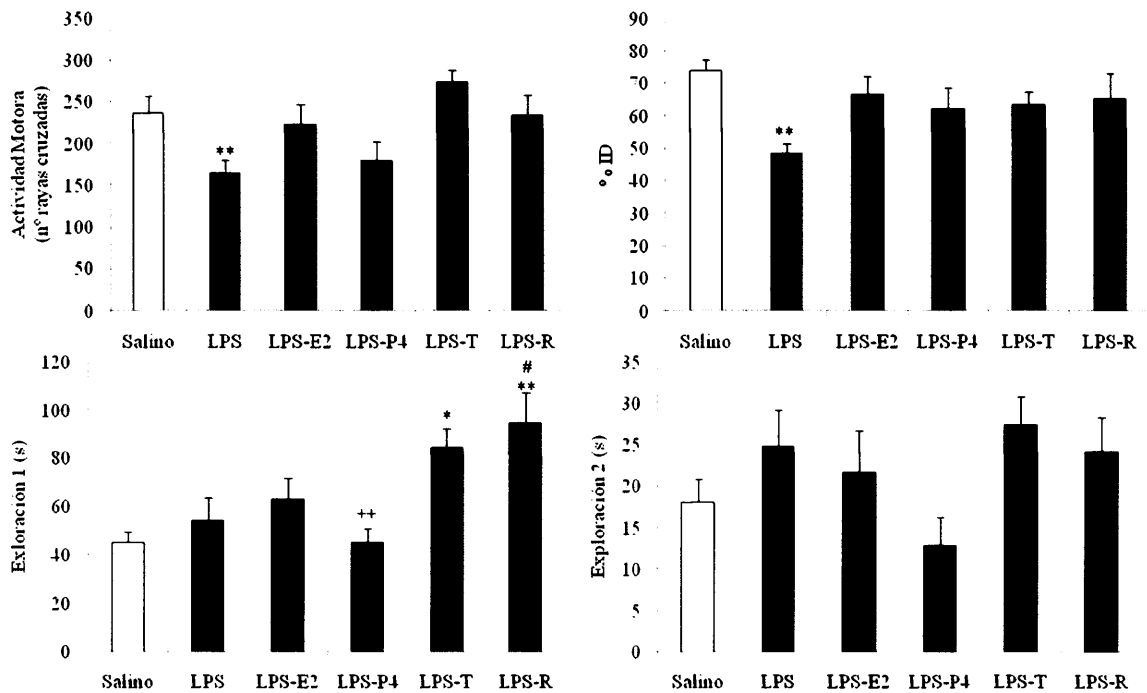


Figura 34: Reconocimiento de objetos en ratas macho tratadas prenatalmente con vehículo (Sal) o LPS y pretratadas con vehículo, estradiol (E2), progesterona (P4), tamoxifeno (T) o raloxifeno (R) antes de la prueba conductual. Actividad Motora: Se observó una diferencia significativa entre los grupos ($p=0,0093$). ** $p<0,01$ LPS frente a Sal. **Exploración 1:** de nuevo observamos una diferencia significativa entre grupos ($p=0,0004$). * $p<0,05$ LPS-T frente a Sal; ** $p<0,01$ LPS-R frente a Sal; # $p<0,05$ LPS-R frente a LPS; ++ $p<0,05$ LPS-P4 frente a LPS-R. **ID:** la diferencia entre grupos también resultó altamente significativa ($p=0,0066$). ** $p<0,01$ LPS frente a Sal. **Exploración 2:** no se apreció ninguna diferencia entre grupos.

Como se puede apreciar en la figura 34, los animales tratados prenatalmente con LPS que recibieron estradiol, progesterona, tamoxifeno o raloxifeno recuperaron una actividad motora comparable a la de los animales que no fueron tratados con LPS ($p=0,093$). El análisis *post hoc* mostró que sólo las ratas tratadas con LPS que recibieron vehículo tenían una menor actividad motora comparadas con el grupo control, no tratado con LPS. Lo mismo sucedió con la ID ($p=0,0066$), las ratas tratadas con LPS que recibieron vehículo tuvieron un ID significativamente inferior a las no tratadas con LPS. Sin embargo las ratas tratadas con LPS que recibieron estradiol, progesterona, tamoxifeno o raloxifeno no mostraron ninguna diferencia con el grupo no tratado con LPS.

Respecto a los tiempos de exploración, en la primera fase del test (exploración 1) también se apreciaron diferencias debidas a los tratamientos ($p=0,0004$). El análisis *post hoc* mostró que las ratas tratadas con LPS que recibieron tamoxifeno o raloxifeno tuvieron

Resultados

un aumento considerable en el tiempo de exploración respecto a las no tratadas con LPS. Este aumento fue más relevante en el caso de las ratas tratadas con raloxifeno, que resultaron ser también significativamente diferentes de las ratas tratadas con LPS que recibieron vehículo o progesterona. Por último, en el tiempo de exploración 2 no se observó ninguna diferencia significativa entre grupos

2.4. Inhibición Prepulso: efecto del LPS prenatal, dimorfismo sexual y acción del estradiol

Inhibición Prepulso en ratas macho

En primer lugar se analizó la respuesta de sobresalto, por un ANOVA de dos vías, para el tratamiento prenatal (LPS o salino) y el tratamiento hormonal (vehículo o estradiol). Los resultados de la inhibición prepulso se analizaron por un ANOVA de tres vías para medidas repetidas, siendo los factores: tratamiento prenatal, tratamiento hormonal e intensidad de prepulso como medida repetida.

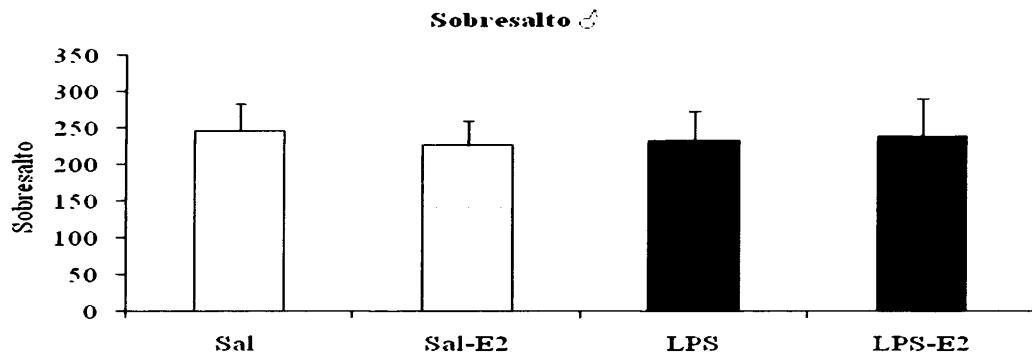


Figura 35: Respuesta de sobresalto en machos tratados prenatalmente con vehículo (Sal) o LPS y tratados a los 2 meses de edad con vehículo o estradiol (E): No se detecta ninguna diferencia entre grupos.

En la respuesta de sobresalto (figura 35) no se observó ningún cambio por ningún factor, lo cual nos permite descartar que posibles cambios en la inhibición prepulso se deban a una distinta respuesta de sobresalto entre grupos.

Resultados

En la inhibición prepulso (figura 36), no se observó un efecto significativo del tratamiento hormonal. El LPS prenatal tendió a disminuir la inhibición prepulso, aunque no significativamente ($p=0,0726$). Se detectó una diferencia significativa del tratamiento prenatal para el prepulso 3, donde los animales tratados con LPS mostraron un valor inferior de la inhibición pre-pulso en comparación a los animales no tratados con LPS. Por último se observó un efecto significativo de la intensidad de prepulso ($p<0,0001$), el cual implica que a mayor intensidad de prepulso, mayor es la inhibición prepulso, hecho que suele suceder en este test.

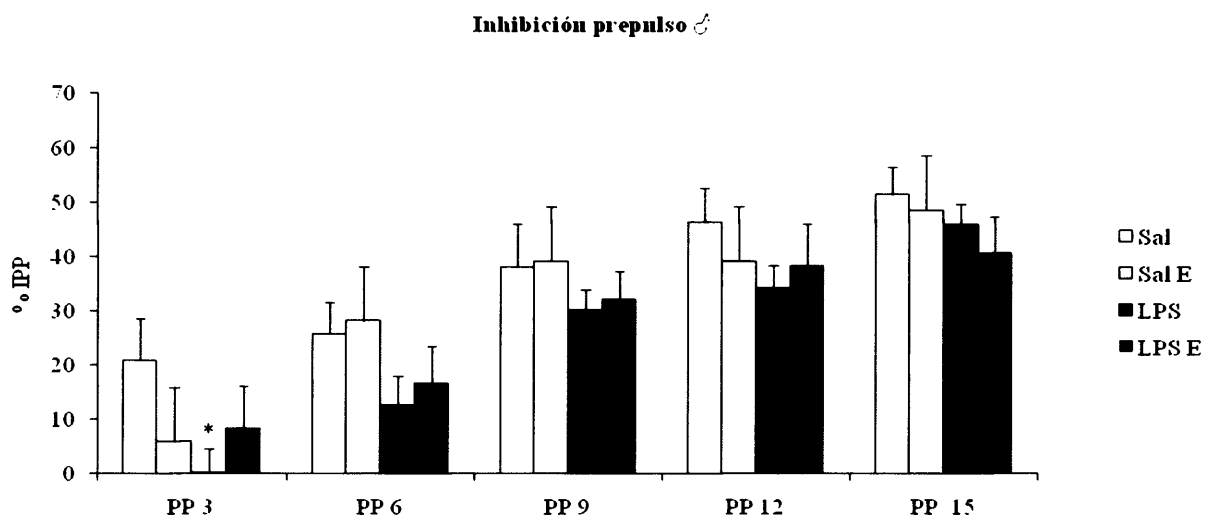


Figura 36: Inhibición prepulso en machos tratados prenatalmente con vehículo (Sal) o LPS y a los 2 meses de edad con vehículo o estradiol (E2). Se observó un efecto significativo de la intensidad de prepulso ($p<0,0001$). Además, hay una diferencia significativa en la inhibición prepulso en el prepulso 3: * $p<0,05$ LPS frente a Sal.

Como resumen de estos resultados, podríamos decir que el LPS no tiene más que una influencia ligera en este test y que el tratamiento con estradiol no ejerce ningún efecto. Se observa una excepción en el prepulso 3, donde hay una diferencia significativa del grupo LPS vehículo con Sal vehículo; dicha diferencia desaparece en el grupo LPS-Tratado con estradiol.

Resultados

Inhibición Prepulso en ratas hembra

En las ratas hembra se realizó el mismo test y los mismos análisis estadísticos. Los animales fueron tratados prenatalmente con vehículo o LPS, con 1 mes de edad los animales fueron *sham*-operados (Sal, LPS) o bien ovariectomizados (Sal-ovx y LPS-ovx), y a los 2 meses de edad fueron tratados con vehículo o con estradiol (Sal-ovx-E2 y LPS-ovx-E2).



Figura 37: Respuesta de sobresalto en hembras. No se observó ninguna diferencia entre grupos

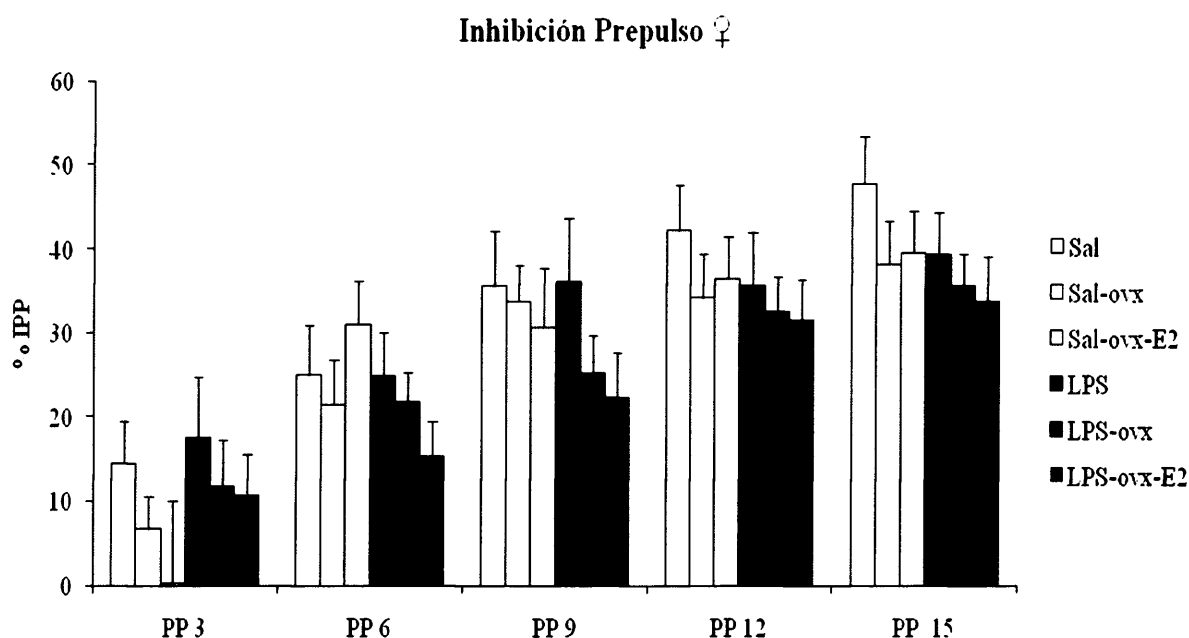


Figura 38: Inhibición prepulso en hembras. No se observó ninguna diferencia por el tratamiento prenatal, ni por la ovariectomía, ni por el tratamiento con estradiol. Se observó un efecto significativo de la intensidad de prepulso ($p < 0,0001$).

Resultados

Al igual que en las ratas machos, no se observó ninguna diferencia en la respuesta de sobresalto (figura 37) ni por tratamiento prenatal, ni por la ovariectomía o por el tratamiento con estradiol. En el caso de la inhibición prepulso (figura 38), no se observó tampoco ninguna diferencia significativa debida a los tratamientos. De nuevo se observó un efecto de la intensidad de prepulso ($p < 0,0001$), de forma que a mayor intensidad se dio en general una mayor inhibición. En conclusión, los resultados nos indican que las ratas hembra no parecen estar afectadas por el tratamiento prenatal, la ovariectomía o el estradiol en el test de inhibición prepulso.

2.5. Hiperlocomoción inducida por anfetamina, efecto del LPS prenatal, dimorfismo sexual y acción del estradiol.

Como se explica en la sección de materiales y métodos, 24 horas antes del experimento de hiperlocomoción inducida por anfetamina (HIA), se realizó un test a todas las ratas para cuantificar la actividad locomotora basal y de esta forma descartar que existieran diferencias previas que pudieran influir el test de HIA. Tras este test, las ratas fueron inyectadas con vehículo o estradiol y 24 horas después se hizo el test de HIA. Este consistió en 30 minutos de habituación tras inyección con salino y a continuación 90 minutos de experimento tras inyección con la anfetamina.

Actividad locomotora basal e hiperlocomoción inducida por anfetamina en ratas macho

En el test de actividad locomotora basal (figura 39), evaluamos ratas macho tratadas prenatalmente con vehículo o con LPS, mediante un ANOVA de dos vías para medidas repetidas, siendo un factor el tratamiento prenatal y factor de medidas repetidas el tiempo (se analizaron los resultados tomando medidas cada 10 minutos). Tras analizar los resultados de la estadística vimos que no hubo ningún efecto del tratamiento prenatal. Sí hubo un efecto significativo del tiempo ($p < 0,0001$) observándose una disminución de la distancia recorrida según iba aumentando éste.

Resultados

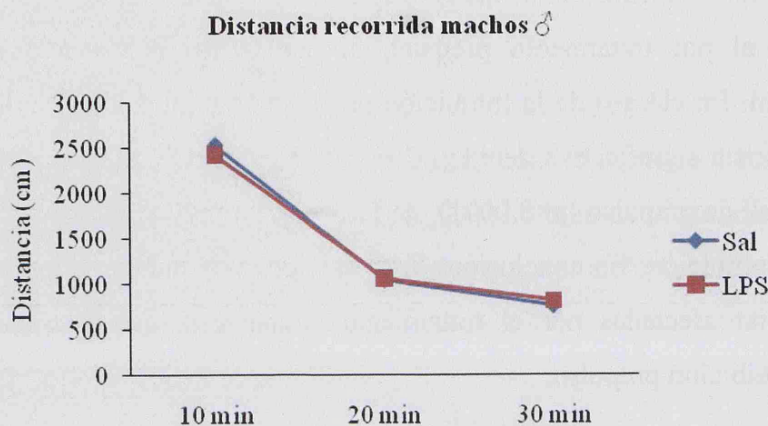


Figura 39: Actividad locomotora basal en machos tratados prenatalmente con vehículo (Sal) o LPS. No hubo ningún efecto del tratamiento prenatal, pero sí del tiempo ($p < 0,0001$), disminuyendo la distancia recorrida según aumentaba este.

Tras la prueba de actividad locomotora basal, se inyectó a las ratas con vehículo o estradiol y 24 horas después se realizó el test de HIA, precedido por otros 30 minutos de medición de actividad locomotora tras inyección con salino.

En los 30 primeros minutos de medición tras inyección con salino, no se observó ninguna diferencia entre grupos (datos no mostrados). Tras la inyección con anfetamina (figura 34), el análisis estadístico de los resultados mostró un efecto significativo del tratamiento prenatal ($p = 0,0131$) y del tratamiento con estradiol ($p = 0,01$). También el tiempo ejerció un efecto significativo ($p < 0,0001$), como es de esperar en esta prueba, en que la locomoción va aumentando con el tiempo, según va haciendo efecto la anfetamina, hasta llegar a un máximo y disminuir conforme van desapareciendo los efectos de esta. Además se observó una interacción significativa entre el tratamiento prenatal y el tratamiento con estradiol ($p = 0,0011$).

Como se puede observar en la figura 40, los animales tratados prenatalmente con LPS y que recibieron vehículo mostraron una menor locomoción que los animales de los otros grupos experimentales. El estradiol no ejerció un efecto significativo en los animales que no recibieron prenatalmente LPS. Por el contrario, en los animales tratados prenatalmente con LPS, que tienen una respuesta disminuida a la anfetamina, el estradiol aumentó su respuesta a niveles de los animales que no recibieron LPS.

Resultados

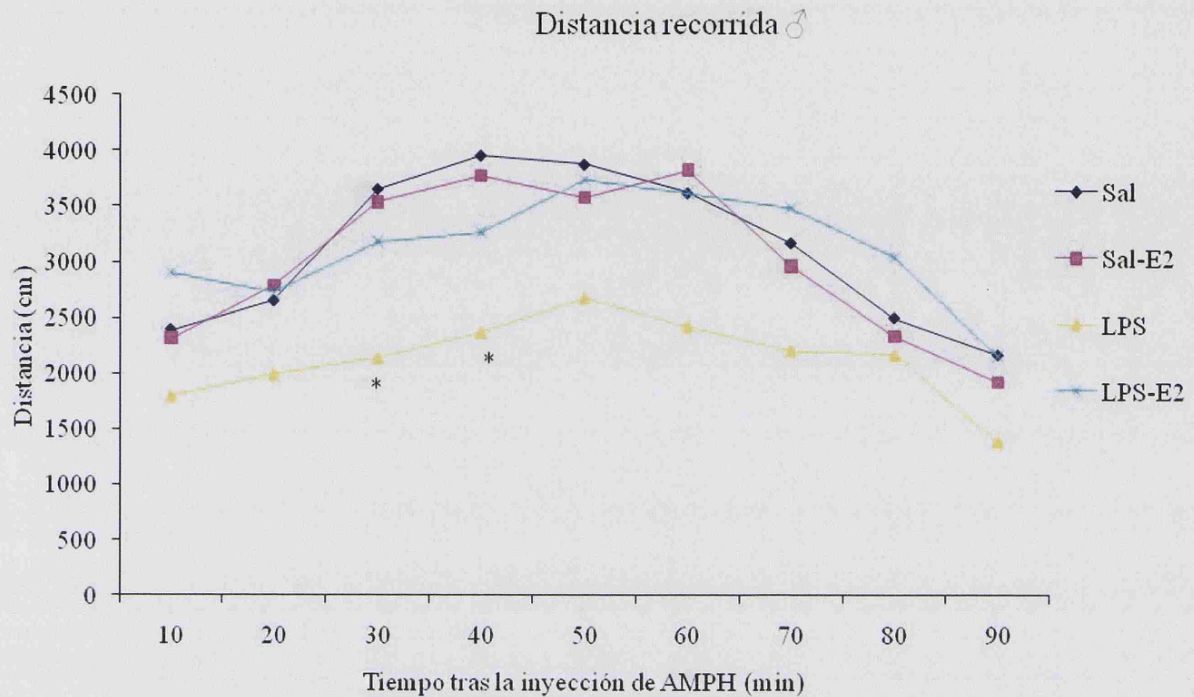


Figura 40: Hiperlocomoción inducida por anfetamina en machos tratados prenatalmente con vehículo (Sal) o LPS y que recibieron vehículo o estradiol (E2). Se observaron efectos significativos del tratamiento prenatal ($p=0,0131$), del tratamiento por estradiol ($p=0,01$) y del tiempo ($p<0,0001$), así como una interacción entre el tratamiento prenatal y hormonal ($p=0,0011$). * $p<0,05$ LPS frente a todos los demás grupos.

Actividad locomotora basal e hiperlocomoción inducida por anfetamina en ratas hembras

Al igual que en las ratas macho, en la prueba de actividad locomotora basal realizada 24 horas antes de la HIA, las hembras no mostraron ninguna diferencia por tratamiento prenatal, ovariectomía o estradiol (figura 41), aunque sí observamos una disminución en la distancia recorrida al aumentar el tiempo ($p<0,0001$), igual que en las ratas macho. Tampoco se observó ninguna diferencia en la medida de 30 minutos tras inyección de salino, previa a la inyección con anfetamina (datos no mostrados).

Resultados

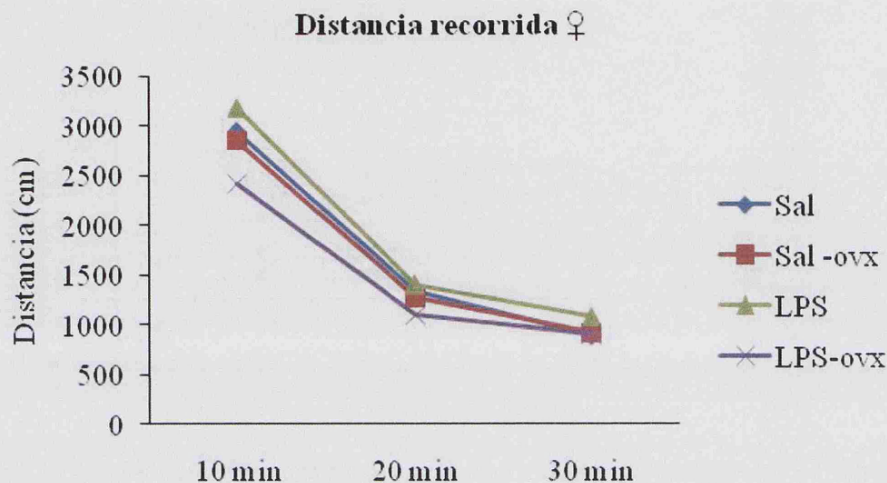


Figura 41: Actividad locomotora basal en hembras tratadas prenatalmente con vehículo (Sal) o LPS y que fueron sham operadas u ovariectomizadas (ovx). No se observó ninguna diferencia debida al LPS prenatal o la ovariectomía, pero sí se observó un efecto del tiempo ($p < 0,0001$), disminuyendo la distancia recorrida según aumentaba este.

En la hiperlocomoción inducida por anfetamina, los resultados fueron analizados de la misma manera que en los machos, por un ANOVA de 3 vías para medidas repetidas (los factores son tratamiento prenatal, tratamiento hormonal y tiempo como medida repetida), con la única diferencia de que en el factor tratamiento hormonal, en hembras tenemos tres variables: sham, ovx (ovariectomizadas) y ovx-E2 (ovariectomizadas tratadas con estradiol).

Al analizar los resultados (figura 42), encontramos un efecto muy marcado del tratamiento hormonal ($p < 0,0001$) y del tiempo ($p < 0,0001$). No se observó un efecto significativo del tratamiento prenatal, pero sí una interacción del tratamiento prenatal con el tratamiento hormonal ($p = 0,0104$). Al profundizar en el análisis mediante el test post hoc, vimos que a casi todos los tiempos (excepto a los 10 minutos) los grupos OVX, independientemente de si tenían tratamiento prenatal con salino o LPS y de si estaban o no tratados con estradiol, tenían una menor respuesta a la anfetamina que los grupos sham. En concreto, los grupos salino-ovx y salino-ovx-E2 resultaron ser significativamente diferentes del grupo salino. Además, los grupos LPS-ovx y LPS-ovx-E2 resultaron ser significativamente diferentes del grupo LPS a todos los tiempos a partir de 20 minutos de test.

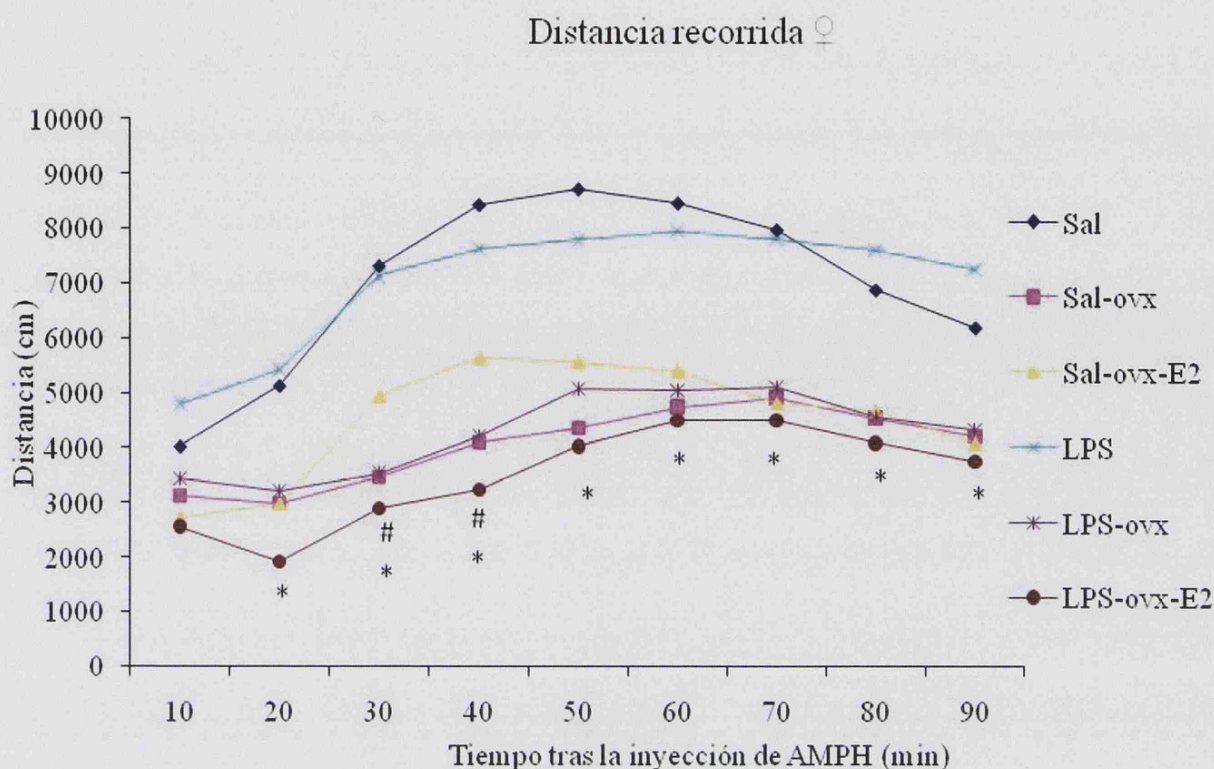


Figura 42: Hiperlocomoción inducida por anfetamina en hembras tratadas prenatalmente con vehículo (Sal) o LPS y que fueron sham operadas u ovariectomizadas (ovx) y posteriormente tratadas con vehículo o estradiol (E2). Se observaron efectos del tratamiento hormonal ($p < 0,0001$) y del tiempo ($p < 0,0001$), así como una interacción entre el tratamiento prenatal y hormonal ($p = 0,0104$). * $p < 0.05$ Sal-ovx y Sal-ovx-E2 frente a Sal; LPS-ovx y LPS-ovx-E2 frente a LPS; # $p < 0.05$ LPS-ovx-E2 frente a Sal-ovx-E2.

Respecto a la interacción entre el tratamiento prenatal y el hormonal, observamos en el análisis post hoc, que en los tiempos 30 y 40 minutos, la distancia recorrida por el grupo LPS-ovx-E2 era significativamente más baja que la de Sal-ovx-E2.

Por lo tanto, podríamos concluir que en hembras, a diferencia de los machos, el LPS prenatal per se no tiene ningún efecto sobre la respuesta a anfetamina. Sin embargo, la privación hormonal por ovariectomía sí que induce una disminución sustancial de esta respuesta. Por último, las hembras ovariectomizadas tratadas prenatalmente con LPS parecen tener una respuesta alterada al estradiol comparadas con las hembras ovariectomizadas tratadas prenatalmente con vehículo, puesto que en estas últimas el estradiol parece aumentar ligeramente la respuesta a anfetamina, cosa que en las primeras no sucede.

Resultados

2.6. Actividad dopaminérgica: efecto del LPS, dimorfismo sexual y acción del estradiol

En este experimento medimos la cantidad relativa de tirosina hidroxilasa (TH) respecto al control de carga (β -Actina) en tres zonas del cerebro relevantes para la esquizofrenia: corteza prefrontal, núcleo accumbens y estriado. El análisis estadístico se realizó mediante un ANOVA de dos vías: un factor fue el tratamiento prenatal (salino o LPS) y el otro factor el tratamiento hormonal. Las variables para el tratamiento hormonal fueron las mismas que en todo el estudio, para machos: vehículo o estradiol y para hembras: sham vehículo (sham), ovariectomía vehículo (ovx) y ovariectomía estradiol (ovx-E2).

Tirosina hidroxilasa en ratas macho

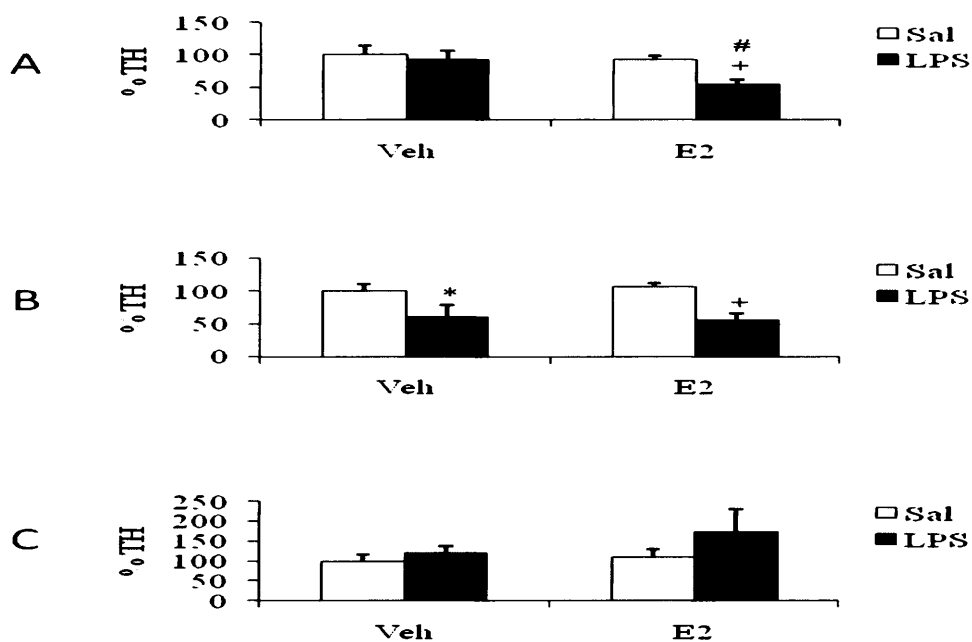


Figura 43: Niveles de TH en ratas macho tratadas prenatalmente con vehículo (Sal) o LPS y que recibieron vehículo o estradiol (E2). A. Corteza prefrontal. Se observó un efecto del tratamiento prenatal ($p=0,0324$) y del tratamiento hormonal ($p=0,0401$). + $p<0,05$ LPS-E2 frente a Sal-E2; # $p<0,05$ LPS-E2 frente a LPS. B. Estriado. Se observó un efecto del tratamiento prenatal ($p=0,001$), pero no del estradiol.* $p<0,05$ LPS frente a Sal; + $p<0,05$ LPS-E2 frente a Sal-E. C. Núcleo accumbens. No se observó ningún efecto del LPS prenatal ni del estradiol.

Resultados

Los cambios observados en los niveles de TH variaron según la zona de estudio (figura 43). En la corteza prefrontal observamos un efecto tanto del tratamiento prenatal ($p=0,0324$) como del estradiol ($p=0,0401$). En el análisis post hoc comprobamos que el estradiol disminuyó los niveles de TH pero solo en las ratas tratadas prenatalmente con LPS. En el estriado observamos un marcado efecto del LPS prenatal ($p=0,001$), pero ningún efecto del tratamiento hormonal. Por último, en el núcleo accumbens, no observamos ningún efecto de los tratamientos sobre los niveles de TH.

Tirosina hidroxilasa en ratas hembras

Los resultados de la medida de TH en ratas hembras se pueden ver en la figura 44. En la corteza prefrontal, el ANOVA mostró efectos significativos del tratamiento prenatal ($p=0,002$) y del tratamiento hormonal ($p=0,0043$), sin interacción entre los factores. Así, en el análisis poshoc pudimos comprobar que mientras que la ovariectomía carecía de efecto (los grupos Sal-ovx y LPS-ovx no fueron diferentes de Sal-sham y LPS-sham, respectivamente), el estradiol produjo un aumento estadísticamente significativo en los niveles de TH en los animales tratados prenatalmente con salino, pero no en los tratados prenatalmente con LPS.

En estriado encontramos una interacción estadísticamente significativa entre los tratamientos prenatal y hormonal ($p=0,0242$). El tratamiento prenatal con LPS redujo los niveles de TH en los animales ovariectomizados tratados con vehículo, pero no en los tratados con estradiol ni en los sham.

Por último, en núcleo accumbens no encontramos ningún efecto del tratamiento prenatal, pero sí de la condición hormonal ($p=0,043$). El tratamiento con estradiol produjo un aumento en los niveles de TH tanto en los animales tratados prenatalmente con salino como en los tratados con LPS.

Resultados

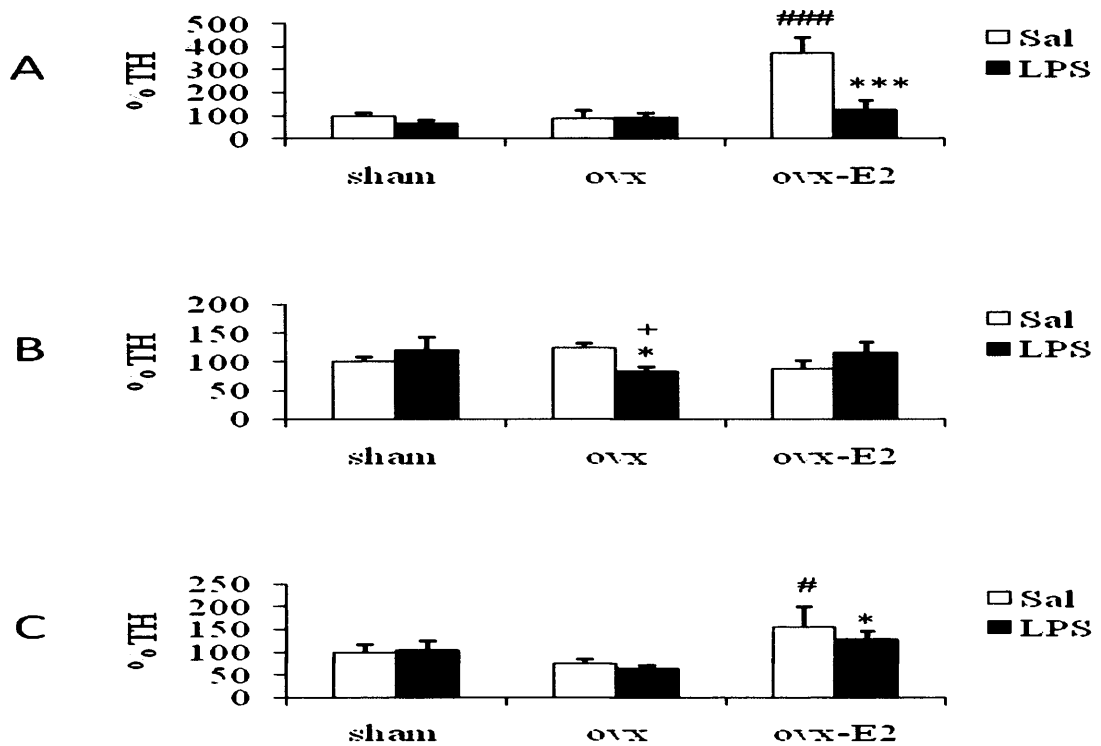


Figura 44: Niveles de TH en ratas hembra tratadas prenatalmente con vehículo (Sal) o LPS y que fueron sham operadas u ovariectomizadas (ovx) y posteriormente tratadas con vehículo o estradiol (E). **A. Corteza prefrontal**, Observamos efectos significativos del tratamiento prenatal ($p=0,002$) y del tratamiento hormonal ($p=0,0043$). $### p<0,001$ Sal-ovx-E2 frente a Sal-ovx y Sal-sham; $*** p<0,001$ LPS-ovx E2 frente a Sal-ovx-E2. **B. Estriado**, Se detectó una interacción significativa entre el tratamiento prenatal y el hormonal ($p=0,0242$). $* p<0,05$ LPS-ovx frente a Sal-ovx; $+ p<0,05$ LPS-ovx frente a LPS-sham. **C. Núcleo accumbens**, El tratamiento hormonal resultó tener un efecto estadísticamente significativo ($p=0,043$), lo cual no sucedió con el tratamiento prenatal, ni hubo interacción entre ambos. $# p<0,05$ Sal-ovx-E2 frente a Sal-ovx; $* p<0,05$ LPS-ovx-E2 frente a LPS-ovx

Resultados

2.7. Marcadores de inflamación sistémicos (IL-1ra y TNF α) y en cerebro (COX-2), efecto del LPS, dimorfismo sexual y acción del estradiol

Niveles de IL-1ra en ratas macho

Los niveles de IL-1ra en suero (figura 45) se cuantificaron con la técnica de ELISA. El LPS, de por sí, no tuvo ningún efecto. El estradiol indujo un aumento significativo en los niveles de IL-1ra en los animales tratados prenatalmente con LPS, pero no en los tratados prenatalmente con salino.



Figura 45: Niveles de IL-1ra en ratas macho tratadas prenatalmente con vehículo (Sal) o LPS y que recibieron vehículo o estradiol (E2). # $p < 0,05$ LPS-E2 frente a los otros grupos experimentales.

Niveles de IL-1ra en ratas hembra

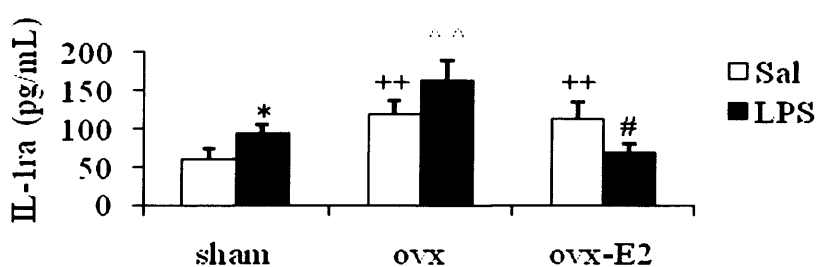


Figura 46: Niveles de IL-1ra en ratas hembra tratadas prenatalmente con vehículo (Sal) o LPS y que fueron sham operadas u ovariectomizadas (ovx) y posteriormente tratadas con vehículo o estradiol (E2). Observamos un efecto del tratamiento hormonal ($p = 0,015$) y una interacción entre este y el LPS prenatal ($p = 0,0176$). ++ $p < 0,01$ Sal-ovx y Sal-ovx-E2 frente a Sal; ^ ^ $p < 0,01$ LPS-ovx frente a LPS; # $p < 0,05$ LPS-ovx-E2 frente a LPS-ovx; * $p < 0,05$ LPS frente a Sal.

Resultados

En hembras (figura 46), el ANOVA mostró efectos significativos del tratamiento hormonal ($p=0,015$), y de la interacción entre este y el tratamiento prenatal ($p=0,0176$). La ovariectomía aumentó los niveles de IL-1ra tanto en los animales tratados prenatalmente con salino como en los tratados con LPS. El estradiol contrarrestó el efecto de la ovariectomía, pero solo en los animales tratados con LPS.

Niveles de TNF α en ratas macho

Los niveles de TNF α en plasma (figura 47) se vieron afectados por el tratamiento prenatal ($p=0,0141$) y se detectó una interacción entre el tratamiento prenatal y el tratamiento hormonal ($p=0,0007$). Como puso de manifiesto el análisis *post hoc*, el LPS prenatal indujo un aumento significativo en los niveles de TNF α en los animales tratados con vehículo. Este efecto fue revertido por el estradiol.

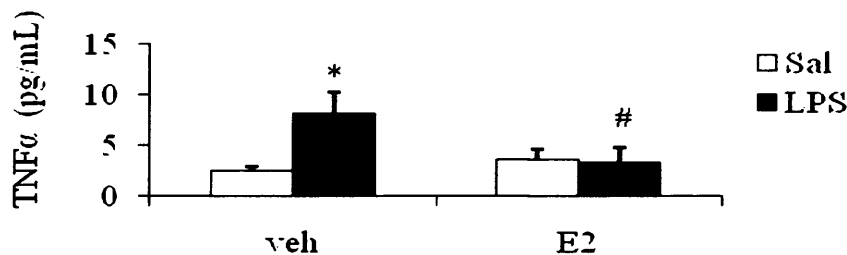


Figura 47: Niveles de TNF α en ratas macho tratadas prenatalmente con vehículo (Sal) o LPS y que recibieron vehículo o estradiol (E). El tratamiento prenatal ($p=0,0141$) y la interacción entre el tratamiento prenatal y el tratamiento hormonal ($p=0,0007$) tuvieron un efecto significativo. * $p<0,05$ LPS frente a Sal; # $p<0,05$ LPS-E frente a LPS.

Niveles de TNF α en ratas hembra

En el caso de las ratas hembra (figura 48), a diferencia de los machos, no encontramos ningún efecto del tratamiento prenatal, ni de la ovariectomía o el estradiol, ni tampoco ninguna interacción.

Resultados

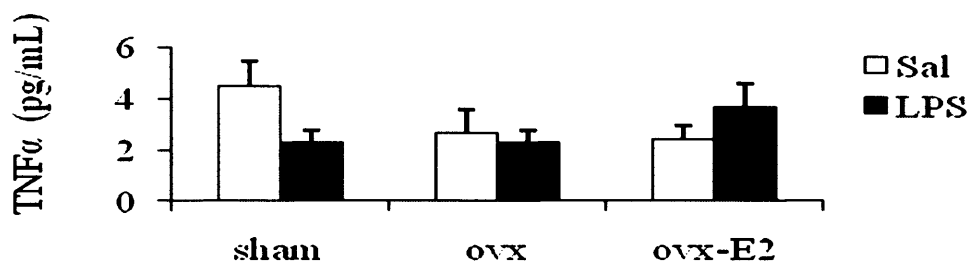


Figura 48: Niveles de TNF α en ratas hembra tratadas prenatalmente con vehículo (Sal) o LPS y que fueron sham operadas u ovariectomizadas (ovx) y posteriormente tratadas con vehículo o estradiol (E2).

Niveles de COX-2 en ratas macho

Se cuantificó COX-2 por Western Blot en corteza prefrontal y núcleo accumbens (figura 49). También se intentó en estriado, pero no se obtuvo ninguna señal cuantificable (tampoco en ratas hembra), por lo que podríamos asumir que las cantidades en este tejido eran demasiado bajas para ser detectadas. El análisis estadístico fue del mismo tipo al empleado en experimentos anteriores (ANOVA de dos vías).

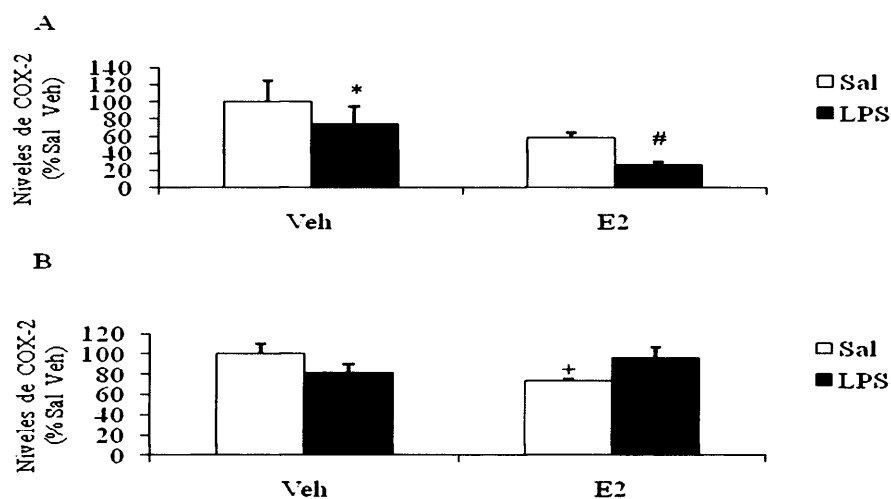


Figura 49: Niveles de COX-2 en ratas macho tratadas prenatalmente con vehículo (Sal) o LPS y que recibieron vehículo o estradiol (E2). **A. Corteza prefrontal**, Observamos un efecto del LPS ($p=0,001$), pero no del estradiol. * $p<0,05$ LPS frente a Sal; # $p<0,05$ LPS-E2 frente a Sal-E2. **B. Núcleo accumbens**, Se encontró una interacción entre el tratamiento prenatal y el hormonal ($p=0,0244$). * $p<0,05$ Sal-E2 frente a Sal; $p=0,0748$ LPS-E2 frente a Sal-E2.

Resultados

En corteza prefrontal se observó un efecto del LPS prenatal ($p=0,001$). Los animales LPS tuvieron menores niveles de COX-2 que los animales tratados prenatalmente con salino, independientemente de si estaban tratados con estradiol o no.

En el núcleo accumbens detectamos una interacción significativa entre el tratamiento prenatal y el tratamiento hormonal ($p=0,0244$). El estradiol disminuyó los niveles de COX-2 en los animales tratados prenatalmente con salino pero no en los tratados prenatalmente con LPS.

Niveles de COX-2 en ratas hembra

Tanto en la corteza prefrontal como en el núcleo accumbens encontramos una influencia muy marcada del LPS prenatal, y de la ovariectomía o la ovariectomía y el tratamiento con estradiol (figura 50). En la corteza prefrontal son significativos los efectos del tratamiento prenatal ($p=0,0302$) y el tratamiento hormonal ($p=0,0007$). También se encontró una interacción estadísticamente significativa entre ambos factores ($p=0,0034$). Al comparar diferencias entre grupos mediante el post hoc, vimos que el tratamiento con estradiol redujo los niveles de COX-2 en los animales tratados prenatalmente con salino, pero no en los tratados prenatalmente con LPS.

En el núcleo accumbens también se apreciaron efectos del tratamiento prenatal ($p<0,0001$), del tratamiento hormonal ($p=0,0009$) y de la interacción entre ambos ($p=0,0001$). La ovariectomía indujo un aumento significativo en los niveles de COX-2 en los animales tratados prenatalmente con salino, pero no en los tratados con LPS. El estradiol revertió el efecto de la ovariectomía.

Resultados

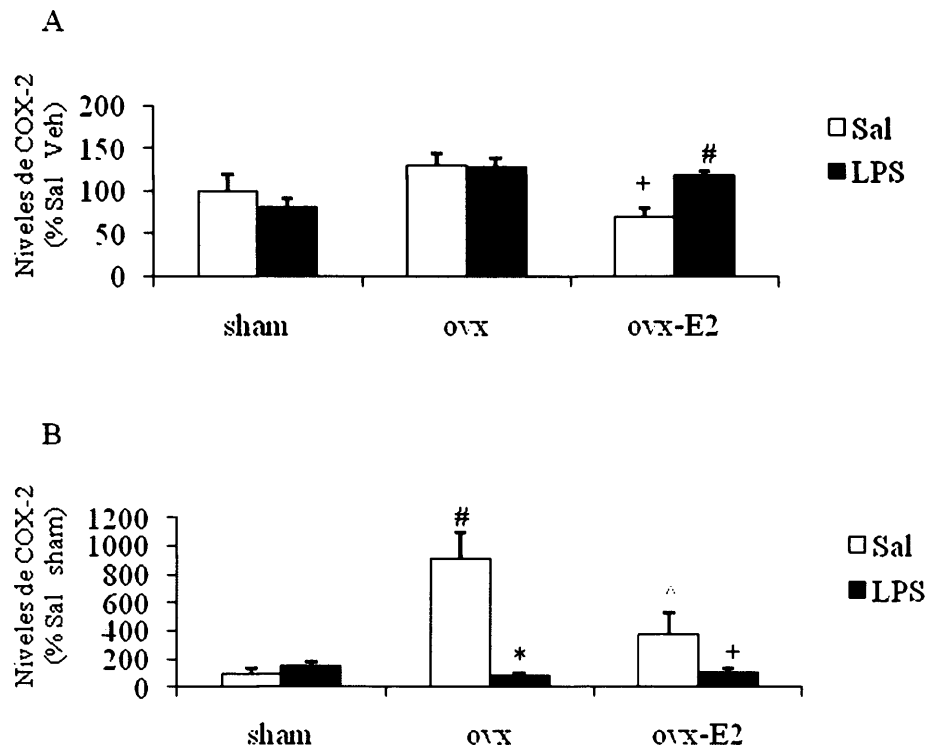


Figura 50: Niveles de COX-2 en ratas hembra tratadas prenatalmente con vehículo (Sal) o LPS y que fueron sham operadas u ovariectomizadas (ovx) y posteriormente tratadas con vehículo o estradiol (E2). **A. Corteza prefrontal,** Observamos un efecto del tratamiento prenatal ($p=0,0302$), del tratamiento hormonal ($p=0,0007$), e interacción entre ambos ($p=0,0034$). $+$ $p < 0,05$ Sal-ovx-E2 frente a Sal- ovx y Sal-sham; $\#$ $p < 0,05$ LPS-ovx-E2 frente a Sal-ovx-E2. **B. Núcleo accumbens,** Observamos un efecto del tratamiento prenatal ($p < 0,0001$) y del tratamiento hormonal ($p=0,0009$), así como una interacción entre ambos factores ($p=0,0001$). $*$ $p < 0,05$ LPS-OVX frente a Sal- ovx; $+$ $p < 0,05$ LPS- ovx -E2 frente a Sal- ovx -E2; $\#$ $p < 0,05$ Sal- ovx frente a Sal-sham y Sal- ovx -E2; $^$ $p < 0,05$ Sal- ovx -E2 frente Sal-sham y Sal- ovx

Resultados

DISCUSIÓN

Discusión

Discusión

1. Efectos del estrés crónico y la privación de hormonas ováricas sobre la conducta depresiva, de ansiedad y anhedonia.

El estrés induce un comportamiento depresivo y una mayor pérdida de peso en ratones ovariectomizados.

En ratones sometidos a estrés y ovariectomía de corta y larga duración, se observó un aumento significativo de la inmovilidad en el test de natación forzada. Sin embargo, en ratones intactos sometidos a estrés y en ratones ovariectomizadas no sometidos a estrés no se observó ningún efecto significativo en este parámetro respecto a los ratones gonadalmente intactos y no estresados. La inmovilidad en el test de natación forzada indica un comportamiento de tipo depresivo, por lo que podemos deducir que la privación de hormonas gonadales de por sí no tiene efecto en nuestro modelo, pero parece predisponer a los animales a un comportamiento depresivo una vez sometidos a estrés.

Se ha descrito en numerosas ocasiones el efecto antidepresivo de la progesterona y el estradiol (Martínez-Mota y cols., 1999; Frye y cols., 2004; Walf y cols., 2004; Rocha y cols., 2005; Walf y Frye, 2007), lo cual es congruente con el aumento de síntomas depresivos que se da en situaciones de descenso en los niveles de hormonas gonadales femeninas como son el síndrome premenstrual, la depresión postparto o la menopausia (Robinson y Stewart, 1986; Bromberger y cols., 2011; Žukov y cols., 2010). Asimismo, el estrés es un factor de riesgo para el desencadenamiento de trastornos del estado de ánimo (Kessler, 1997).

La respuesta al estrés está gobernada por el eje hipófisis-pituitaria-adrenal (HPA): en respuesta a un estrés agudo la hipófisis libera CRH, la cual estimula a la pituitaria que a través de la liberación de ACTH activa a la glándula adrenal para que libere hormonas de estrés al torrente sanguíneo, cortisol en humanos o corticosterona en roedores (Claes, 2004). Al finalizar el estrés, se produce una regulación por retroinhibición que hace que el eje vuelva a sus niveles basales de actividad. En situaciones de estrés crónico, se puede dar una hiperactividad crónica del eje HPA que acaba induciendo modificaciones en la regulación de receptores de glucocorticoides en hipocampo, amígdala y núcleo paraventricular (Rivest y cols., 1995). Esta hiperactividad se ha relacionado con la capacidad del estrés crónico de inducir estados depresivos (Gold y Chrousos, 2002). Las hormonas ováricas, estradiol y progesterona, participan en la regulación de la actividad del

Discusión

eje HPA en ratas hembra (Carey y cols., 1995; Ochedalski y cols., 2007). Además de la actividad basal del eje HPA, la privación de hormonas ováricas también modifica el funcionamiento de eje HPA en respuesta a estrés en roedores hembra, y el tratamiento de reemplazo con estradiol y progesterona revierte las alteraciones observadas. Por ello, es de esperar que una situación de estrés crónico afecte de forma diferente a los ratones ovariectomizados y a los gonadalmente intactos (Seale y cols., 2004).

Mediante estudios farmacológicos con distintos tipos de antidepresivos en el test de natación forzada, se ha establecido una asociación entre el comportamiento de natación y sustancias agonistas de los receptores de serotonina y entre el comportamiento de *climbing* y una mayor neurotransmisión por catecolaminas. (Detke y cols., 1995). Examinando nuestros resultados, se puede apreciar que los grupos con ovariectomía y estrés presentan un tiempo de natación significativamente menor que los demás grupos, sin mostrar ninguna variación en su tiempo de *climbing*, lo que podría sugerir que la suma del estrés y la ovariectomía afecta principalmente a las vías serotoninérgicas. Esto es coherente con el papel de la serotonina en depresión (Sharp y Cowen, 2011) y con la compleja regulación ejercida por el estradiol sobre la neurotransmisión serotoninérgica, que abarca desde la modulación de la síntesis de la serotonina por la enzima triptófano hidroxilasa hasta su degradación por la monoaminoxidasa, pasando por efectos en la expresión de transportadores y receptores en distintas áreas del cerebro (revisado por Etgen y García-Segura, 2009).

El efecto depresor del estrés fue mucho más pronunciado en ratones sometidos a ovariectomía de larga duración, puesto que mostraron niveles de inmovilidad significativamente mayores que los de los ratones con ovariectomía de corta duración. Este efecto también se observó en la ganancia de peso durante el estrés: los ratones con ovariectomía de larga duración sometidos a estrés perdieron peso durante el protocolo de estrés crónico, lo cual se interpreta como una medida más de deterioro físico causado por el estrés (Willner, 1997; Surget y cols., 2008; Autry y cols., 2009).

Discusión

La ovariectomía de larga duración induce comportamiento tipo ansiedad, que es aumentado por el estrés crónico.

Nuestros resultados indican que la privación hormonal por gonadectomía induce mayores niveles de ansiedad, puesto que disminuyó el tiempo en brazos abiertos en el laberinto en cruz elevado. Este efecto llegó a ser significativo en el grupo de ovariectomía de larga duración sin estrés y en mayor medida en el grupo de ovariectomía de larga duración sometido a estrés crónico. Nuestros resultados están de acuerdo con numerosos estudios en los que se ha demostrado el efecto ansiolítico de las hormonas ováricas, o el efecto ansiogénico de la privación de estas (Estrada-Camarena y cols., 2003; Frye y cols., 2004; Frye y Walf, 2004; Frye y Wawrzycki, 2003; Koss y cols., 2004; Rachman y cols., 1998; Walf y Frye, 2005a, 2005b, 2006, 2007). Además, el estrés crónico puede inducir estados de ansiedad en roedores (Mineur y cols., 2006), lo cual está de acuerdo con el hecho de que la ovariectomía junto al estrés inducen el efecto máximo observado en el laberinto en cruz elevado.

Nuestros datos reflejan que la ovariectomía, por sí misma, ya induce un estado de ansiedad, de acuerdo con lo observado en humanos, en donde la privación de hormonas ováricas aumenta los niveles de ansiedad (Weissman y Klerman, 1977; Bebbington y cols., 1981; Wittchen y Hoyer, 2001; Walf y Frye, 2006). En conjunción con el estrés, la ovariectomía aumenta la conducta asociada a la ansiedad y esto se correlaciona con la aparición de comportamientos depresivos (lo que no ocurría en ratones ovariectomizados sin estrés). Por tanto, podríamos pensar que la ovariectomía induce un estado de ansiedad que deja expuestos a los ratones a los efectos depresivos del estrés, lo cual se asemeja a lo que ocurre en humanos, en donde se ha demostrado que trastornos de tipo ansioso constituyen factores de riesgo para el desarrollo de trastornos depresivos (Breslau y cols., 1995; Bittner y cols., 2004; Zender y Olshansky, 2009).

El estrés crónico induce una disminución en el consumo de sacarosa en ratones gonadalmente intactos, pero no en los ovariectomizados.

La disminución del consumo de una solución de sacarosa en roedores en respuesta a estrés, se utiliza habitualmente como modelo de anhedonia, que constituye uno de los principales síntomas de la depresión mayor (Hamilton, 1967; Monleon y cols., 1995). En nuestro caso, observamos que en ratones gonadalmente intactos el estrés disminuyó la

Discusión

preferencia por sacarosa en la tercera semana del protocolo de estrés crónico. Sin embargo, en ratones sometidos a ovariectomía con o sin estrés, no se produjo en ningún momento un descenso en el consumo de sacarosa.

El descenso observado en los ratones intactos está en consonancia con otros estudios que han demostrado en ratas que diversos protocolos de estrés crónico inducen una disminución en el consumo de sacarosa (Willner y cols., 1987; Monleon y cols., 1995; Rygula y cols., 2005). El hecho de que la disminución en consumo de sacarosa fuera evidente en la tercera semana coincide con el trabajo de Pothion en que se comparan varias cepas de ratones sometidas a estrés crónico durante varias semanas y se demuestra que el máximo efecto en la cepa C57/BL6 es en la tercera semana de estrés. (Pothion y cols., 2004). Una diferencia es que en nuestro caso ese efecto sólo se observa en la tercera semana, pero quizás se podría achacar a dos factores: el primero es que nuestro protocolo de estrés se podría considerar una versión más ligera de los empleados habitualmente, al no incluir estresores físicos o dolorosos como privación de alimentos o agua, inmovilización o pellizco de la cola (Pothion y cols., 2004; Baker y cols., 2006; Grønli y cols., 2004; Li y cols., 2009; Tynan y cols., 2010; Mällo y cols., 2009), ya que pensamos que así se modelizaría mejor un estrés puramente psicológico, por lo que es de esperar que los efectos sean menos drásticos. El segundo factor es que nuestro estudio es con ratones hembra, mientras que en la mayor parte de estudios que se han realizado, ha sido con ratas o ratones macho, por lo que los resultados no tienen porqué ser obligatoriamente los mismos teniendo en cuenta que el comportamiento de ingesta y el consumo de sacarosa varían según el sexo y los niveles circulantes de estradiol (Atchley y cols., 2005; Liang y cols., 2007).

El dato que más llama la atención en nuestros resultados es que los grupos con ovariectomía, sea de corta o larga duración no parecen responder al protocolo de estrés crónico en este test, pese a que en los otros tests de depresión y ansiedad sí parecen mostrar efectos negativos del estrés. Una posible explicación reside en el hecho de que el estradiol es una hormona que inhibe la ingesta, y su privación por ovariectomía aumenta esta (Kenney y Mook, 1974; Wade, 1975; Blaustein y Wade, 1976; Wade y cols., 1985; Butera y Beikirch 1989; Geary y cols., 1995), por tanto este factor puede estar haciendo que el consumo de sacarosa no se vea alterado en ratones ovariectomizados. Otro dato a tener en cuenta es que en varios estudios (Ely y cols., 1997; Pecoraro y cols., 2004; Rossi y

cols., 2008; Ulrich-Lai y cols., 2010; Ulrich-Lai y cols., 2011; Ortolani y cols., 2011) se ha observado que una posible reacción en situaciones de mayor ansiedad es el aumento de ingesta de lo que se ha venido a denominar comida de confort. Por ejemplo en el trabajo de Ortolani, ratas que han sido sometidas a choques eléctricos disminuyen su ingesta de pienso, pero no la de comida de confort que consiste en una mezcla de frutos secos, dulces y chocolate (Ortolani y cols., 2011). Este consumo preferente de alimento altos en grasa y carbohidratos en respuesta a estrés en algunos casos ha llegado incluso a normalizar determinados parámetros relevantes para la respuesta a estrés, como los niveles de corticosterona en sangre (Pecoraro y cols., 2004; Rossi y cols., 2008; Ulrich-Lai y cols., 2010; Ulrich-Lai y cols., 2011)

2. Efectos del estrés crónico y la privación de hormonas ováricas en las células de glía y la proliferación celular en el giro dentado

La ovariectomía induce un aumento en la densidad de astrocitos en el giro dentado del hipocampo

Se ha descrito que la privación hormonal por ovariectomía puede inducir un estado inflamatorio en el organismo (Kíreev y cols., 2010; Abu-Taha y cols., 2009; Baeza y cols., 2011; Surmeli y cols., 2011; Routley y Ashcroft, 2009). Asimismo, también se ha relacionado la depresión con un aumento en los niveles de citoquinas proinflamatorias (Maes, 1999), estando estas correlacionadas con los síntomas depresivos y respondiendo al tratamiento con antidepresivos (Śluzewska y cols., 1995; Maes y cols., 1999; Anisman y col., 1999). También en modelos de estrés en ratones se ha establecido que un aumento en IL-1 en cerebro podría estar relacionado con la expresión de comportamientos depresivos (Goshen y cols., 2007; Kwon y cols., 2008). Por este motivo, consideramos interesante examinar posibles cambios en las células de glía por inmunohistoquímica para determinar los efectos de la ovariectomía y el estrés crónico en nuestro modelo.

No encontramos ningún cambio en el marcaje para IBA-1, que representaría microglía, sin embargo tanto la inmunoreactividad para GPAP, que marca astrocitos, como para NG2, que marca precursores de oligodendrocitos, se vieron fuertemente afectadas por la ovariectomía, pero no por el estrés. En roedores se ha descrito que la población de astrocitos aumenta rápidamente en respuesta a diversos tipos de lesiones (Martinez y cols., 2006; Barreto y cols., 2009), a su vez el estradiol puede reprimir la expresión de GFAP y

Discusión

regular su transcripción (Day y cols., 1993; Stone y cols., 1998). Además se ha propuesto que el estradiol puede inducir un crecimiento de neuritas tras una lesión, mediado por la inhibición de GFAP.

También se ha observado que la progesterona tiene un efecto reductor de la proliferación de astrocitos en respuesta a lesión (Labombarda y cols., 2011) y tras ovariectomía (Camacho-Arroyo y cols., 2011) por lo que resulta coherente lo que observamos en nuestros resultados, en que la privación de hormonas ováricas induce un aumento en la inmunoreactividad para GFAP.

La ovariectomía induce un aumento en el número de células NG2 en el giro dentado del hipocampo, independientemente del estrés crónico

Las células NG2 se conocen principalmente como precursores de oligodendrocitos (Stallcup y Beasley, 1987; Levine y cols., 1993; Levine y cols., 2001) y se ha descrito su papel en situaciones de lesión, en que aumenta su proliferación para formar parte de la cicatriz glial (Fawcett y Asher 1999; Levine y cols., 2001), ya que a través de la generación de oligodendrocitos pueden reparar la desmielinización causada por lesiones o patologías como la esclerosis múltiple (Keirstead y cols., 1998; Watanabe y cols., 2002; Reynolds y cols., 2002). Además de progenitoras de oligodendrocitos, también se han sugerido otros roles para las células NG2, puesto que se ha observado que tienen la capacidad de diferenciarse a astrocitos (Diers-Fenger y cols., 2001; Alonso, 2005), e incluso ha llegado a sugerirse que en vez de ser sólo precursores de oligodendrocitos, puedan actuar como células madre neurales (Belachew y cols., 2003; Aguirre y Gallo, 2004) ya que no todas las células que expresan NG2 provienen de la misma línea que los oligodendrocitos (Mallon y cols., 2002).

En nuestros resultados observamos que la privación de hormonas ováricas por ovariectomía indujo en todos los casos un aumento de células NG2, independientemente del estrés crónico, que no tuvo ningún efecto. Estudios previos han mostrado que en las ratas ovariectomizadas existe una mayor mielinización que podría deberse a una mayor presencia de progenitores de oligodendrocitos (Yates y Juraska, 2008), mientras que las hembras intactas muestran menor cantidad de oligodendrocitos que los machos (Cerghet y cols., 2006). Por tanto nuestros resultados están en consonancia con lo descrito por otros autores, ya que el estradiol parece disminuir la cantidad de oligodendrocitos, por lo que

Discusión

resulta lógico que su ausencia induzca un aumento de estos. También se han descrito efectos de la progesterona sobre el grado de mielinización (Ghoumari y cols., 2005; De Nicola y cols., 2006; Garcia-Segura y Melcangi, 2006), aunque en sentido opuesto al estradiol ya que parecen promoverla en sistema nervioso central y periférico.

Respecto al papel que puede jugar el aumento de células NG2 en nuestro modelo, es interesante señalar que las células NG2 son capaces de sintetizar progesterona y sus metabolitos, ya que poseen las enzimas necesarias para ello (Gago y cols., 2001; Gago y cols., 2004; Ghoumari y cols., 2005) a diferencia de los oligodendrocitos maduros (Mellon, 2007) por lo que una hipótesis es que en respuesta a la ovariectomía aumente su proliferación para compensar la pérdida de progesterona ovárica. Otra hipótesis que explicaría el aumento de células NG2 sería que se estén comportando como precursoras de astrocitos, que también aumentan debido a la ovariectomía, ya que se ha demostrado in vivo y en vitro que las células NG2 tienen la capacidad de diferenciarse a astrocitos. (Stallcup y Beasley, 1987; Diers-Fenger y cols., 2001; Alonso y cols., 2005).

La privación de hormonas ováricas por ovariectomía de corta y larga duración induce una disminución de proliferación celular en el giro dentado del hipocampo, independientemente del estrés

El estrés agudo y crónico reduce la proliferación en giro dentado en el hipocampo de roedores (Falconer and Galea, 2003, Mineur y cols., 2007; Shors y cols., 2007; Westenbroek y cols., 2004), y esta disminución ha sido asociada con comportamientos de tipo depresivo (Brummelte y cols., 2006; Darnaudéry y cols., 2006; Fuchs y cols., 2004; Schmitz y cols., 2002; Swaab y cols., 2005). También los antidepresivos inducen un aumento de neurogénesis (Santarelli y cols., 2003). Por otro lado, el estradiol regula la neurogenesis en el hipocampo de las hembras (Pawluski y cols., 2009; Tanapat y cols., 1999, 2005) por lo que consideramos importante determinar el papel de la proliferación celular en giro dentado en la formación de conductas depresivas en nuestro modelo debidas al estrés y a la privación hormonal ovárica.

En la inmunohistoquímica para BrdU, observamos que los grupos de ratones sometidos a ovariectomía de corta y larga duración, mostraban en todos los casos una disminución de proliferación respecto a las hembras intactas, independientemente de si habían sido estresadas o no. Esto está de acuerdo con el papel del estradiol en neurogénesis

Discusión

en los estudios citados anteriormente. Sin embargo, nuestro estudio no coincide con el de Lagace que en ratones hembra C57/BL6 no encuentra ninguna diferencia en la proliferación celular en el giro dentado debida al ciclo estral o a la ovariectomía (Lagace y cols., 2007). Esta discrepancia puede deberse a que en su trabajo los ratones son jóvenes (2 meses) y la ovariectomía es de 3 semanas, mientras que en el nuestro los ratones son sacrificados con 7 meses de edad, y el tiempo de privación hormonal es de 6 semanas o 5 meses. Esto nos podría estar indicando que la proliferación celular en hipocampo es más dependiente del estradiol cuanto mayor es la edad de los roedores, y también que la falta de estradiol incide en la proliferación cuando el tiempo de privación hormonal es más largo.

Posiblemente, los receptores de estrógeno α y β estén implicados en el efecto del estradiol en neurogénesis, puesto que varios estudios han demostrado que ambos están presentes en el hilus del giro dentado del hipocampo (Weiland y cols., 1997; Orikasa y cols., 2000; Blurton-Jones y cols., 2004), y además colocalizan con células marcadas con BrdU y/o Ki-67, que constituye otro marcador de proliferación celular (Perez-Martin y cols., 2003). También es posible que el efecto del estradiol se ejerza a través de sus receptores de membrana, ya que estos han sido identificados en hipocampo de roedores hembra (Kalita y cols., 2005). El estradiol regula numerosos factores de crecimiento (Etgen y García-Segura, 2009) a través de los cuales puede modular la proliferación celular. Una evidencia de este efecto del estradiol proviene de la observación de que la inhibición de su receptor impide la inducción por IGF-1 de neurogénesis adulta (Pérez-Martin y cols., 2003).

El hecho de que el estrés no afecte a la proliferación en nuestro modelo podría parecer en contradicción con otros trabajos que sí encuentran este efecto (Falconer and Galea, 2003, Mineur y cols., 2007; Shors y cols., 2007; Westenbroek y cols., 2004). Sin embargo, se ha observado que el estrés afecta a la proliferación celular en roedores machos, pero no en hembras (Falconer and Galea, 2003, Shors y cols., 2007; Westenbroek y cols., 2004). Además nuestros resultados coinciden con los de Mineur, que demostró que el estrés crónico no afecta a la proliferación celular en ratones hembras C57BL/6 (Mineur y cols., 2007), que es la misma cepa que utilizamos nosotros. Esto sugiere que pese a la relación que se ha establecido entre depresión y disminución de neurogénesis, quizá una disminución de neurogénesis por sí misma no sea capaz de inducir comportamiento depresivo como se observa en nuestros resultados. Los ratones con ovariectomía de corta

Discusión

duración no sometidos a estrés muestran menos proliferación, pero no presentan comportamiento tipo depresión en el test de natación forzada. Por tanto quizás un defecto en neurogénesis o proliferación celular sea más un factor de riesgo que un desencadenante directo de conductas depresivas

3. Efecto de las hormonas ováricas y los SERMs sobre las conductas asociadas a ansiedad y depresión causadas por el estrés crónico y la privación de hormonas ováricas

El estradiol, la progesterona y los SERMs tamoxifeno y raloxifeno disminuyen los comportamientos asociados a depresión y ansiedad en ratones ovariectomizados y sometidos a estrés crónico

Tanto la progesterona como los compuestos estrogénicos estradiol, tamoxifeno y raloxifeno, disminuyeron la conducta de inmovilidad de los ratones ovariectomizados y estresados al nivel de los ratones intactos no estresados. En el caso de la progesterona y el estradiol, nuestros datos están de acuerdo con numerosos estudios en ratas y ratones que atribuyen un efecto antidepresivo a estas hormonas (Bernardi y cols., 1988; Rachman y cols., 1998; Walf y Frye, 2010; Walf y cols., 2004; Frye y Walf, 2009; Frye y cols., 2006). Aunque se ha descrito que el estradiol aumenta la actividad locomotora espontánea, las evidencias provienen de estudios en que se requerían tratamientos de varios días para observarse este efecto (revisado por Lightfoot, 2008). Dado que nuestro tratamiento fue agudo y una hora antes del test, asumimos que el efecto de los tratamientos se puede interpretar como antidepresivo, más que inductor de actividad locomotora.

El efecto antidepresivo del estradiol puede estar relacionado con su modulación de la neurotransmisión serotoninérgica, ya que, como se ha indicado anteriormente, esta hormona regula la disponibilidad de serotonina (Luine y Mc Ewen, 1977) y la expresión de sus transportadores y sus receptores (Bethea y cols 2002, Cyr y cols 2000). Se ha propuesto que el mecanismo está mediado por el receptor de estrógenos β , puesto que agonistas selectivos de este receptor producen los mismos efectos antidepresivos en el test de natación forzada que el estradiol, mientras que agonistas selectivos del receptor de estrógenos α no ejercen ningún efecto (Walf y cols., 2004). En nuestro caso, puesto que el tratamiento se realizó una hora antes del test podríamos suponer que el estradiol, al igual

Discusión

que los demás tratamientos, está ejerciendo su efecto por un mecanismo rápido, puesto que un mecanismo genómico requeriría más tiempo (McEwen, 1976). Quizás una posibilidad sería que estuviera actuando de una forma no genómica a través de los receptores α o β , puesto que se ha observado que estos receptores también se expresan en membrana y pueden activar mecanismos rápidos de señalización (Razandi y cols., 1999; Arvanitis y cols. 2004; Kelly y Rønnekleiv, 2008; Marín y cols., 2005; Micevych y Mermelstein, 2008; Hirahara y cols., 2009).

La acción ansiolítica y/o antidepresiva de la progesterona se puede ejercer por varios mecanismos. Uno es su conversión a allopregnanolona (Beckley y Finn, 2007), debido a la acción moduladora de este metabolito sobre los receptores GABA_A (Rodríguez-Sierra y cols., 1984; Schwartz, 1988; Majewska y Vaupel, 1991; Rupprecht, 2003). Asimismo, se ha demostrado que la falta de conversión de progesterona a otros metabolitos disminuye sus efectos ansiolíticos y antidepresivos (Frye y cols., 2004; Beckley y Finn, 2007). También se ha propuesto una acción ansiolítica directa de la progesterona a través de los receptores de progestinas (Kellogg y Barrett, 1999; Auger y Forbes-Lorman, 2008).

A pesar de la amplia información referente a la capacidad neuroprotectora de los SERMs en diversos modelos (Arevalo y cols., 2011), poco se sabe de su potencial actividad antidepresiva y/o ansiolítica. En nuestros experimentos tanto el tamoxifeno como el raloxifeno demostraron reducir el tiempo de inmovilidad en el test de natación forzada, así como aumentar el tiempo en brazos abiertos en el laberinto en cruz elevado, sugiriendo así una actividad antidepresiva y ansiolítica. Respecto al raloxifeno, estudios en modelos animales (Walf y Frye, 2010b) sugieren que este SERM disminuye el comportamiento relacionado con ansiedad en el laberinto en cruz elevado en ratas ovariectomizadas y también la conducta depresiva en el test de natación forzada (Walf y cols., 2010b; Karahancer y cols., 2008). Incipientes estudios en mujeres postmenopáusicas sugieren también un efecto positivo del raloxifeno sobre la ansiedad y los síntomas depresivos (Carranza-Lira y cols., 2007, Jarkova y cols., 2002; NB, Strickler y cols., 2000; Karsidag y cols., 2010). El raloxifeno podría ejercer una acción similar al estrógeno en el sistema

Discusión

serotoninérgico, lo que podría formar parte de su mecanismo regulador del estado de ánimo (Bernardi 2003; Bethea 2002 y cols; Cyr y cols 2000).

Respecto al tamoxifeno existen aún menos estudios acerca de sus acciones sobre ansiedad y depresión. Se ha descrito que el tamoxifeno reduce la conducta asociada a la ansiedad en ratas ovariectomizadas (Kazakova y cols., 2007). No obstante, en algunos casos se ha llegado a asociar la utilización de tamoxifeno en humanos con una mayor incidencia de síntomas depresivos (Thompson y cols., 1999), aunque otros estudios (Day y cols., 2001, Ganz, 2001; Lee y cols., 2007) no han encontrado relación entre el uso de tamoxifeno y el desarrollo o empeoramiento de depresión. En nuestro modelo hemos observado una actividad antidepresiva y ansiolítica, lo cual sugiere que podría estar actuando por un mecanismo rápido similar al del estradiol.

4. Influencia del LPS prenatal sobre la señalización por IGF-1 y los receptores de estrógenos

El LPS prenatal induce un aumento del receptor de estrógenos β en corteza prefrontal

La vía del factor de crecimiento asociado a insulina o IGF-1, regula una variedad de eventos relevantes para el desarrollo del sistema nervioso como es la neurogénesis o la plasticidad sináptica, así como la liberación de factores neuroendocrinos y el comportamiento reproductivo (Etgen y cols., 2006; Mendez y cols., 2006; Todd y cols., 2007). Asimismo, en animales adultos promueve la neurogénesis en el hipocampo (Aberg, 2010; Anderson y cols., 2002). También se han observado efectos conductuales ansiolíticos y antidepresivos en estudios con animales (Malberg y cols., 2007) y efectos cognitivos en humanos (Aleman y cols., 2000; Morley y cols., 1997) y roedores (Markowska y cols., 1998).

Se ha sugerido que varias enfermedades como la esquizofrenia y el Parkinson podrían tener su origen en un neurodesarrollo defectuoso. (Feinberg, 1982; Barlow y cols., 2007). El IGF-1, como mencionábamos, juega un papel muy importante en el desarrollo a través de la regulación de múltiples vías como la de las MAPK/ERK y de la

Discusión

fosfatidilinositol 3 kinasa (PI3K) (Cardona-Gomez y cols., 2001; Bondy y Cheng, 2004). Este efecto es ejercido en colaboración con el estradiol, puesto que se ha observado que ambos pueden regular estas vías, y además las acciones del estradiol son bloqueadas cuando se inhibe la señalización por IGF-1 y las acciones del IGF-1 son bloqueadas cuando se inhiben los receptores de estrógeno (Etgen y cols., 2006; Mendez y cols., 2006; Todd y cols., 2007). Curiosamente, se ha comprobado que pacientes con esquizofrenia aún no tratados farmacológicamente, tienen menores niveles de IGF-1 en suero (Venkatasubramanian y cols., 2007) y también presentan *postmortem* menores niveles de GSK3 β en corteza prefrontal (Beasley y cols., 2001).

En nuestros resultados observamos que no hubo ningún cambio en los niveles de receptores de estrógeno, ni de IGF-1, salvo en la corteza prefrontal en la que los animales tratados prenatalmente con LPS mostraron mayores niveles del receptor de estrógenos beta (ER β). Se sabe que el receptor α de estrógenos (ER α) está implicado en la activación por estradiol de la vía de PI3K, a través de su interacción con el receptor de IGF-1 en hipotálamo (Mendez y cols., 2003; Mendez y cols., 2006) sin embargo otros estudios indican que en neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra sí existe una asociación entre el ER β de estrógenos y el receptor de IGF-1 (Quesada y cols., 2007), y en neuronas corticales, no está descartado que pudiera darse una activación de la vía de PI3K por el ER β (Mannella y Brinton, 2006). La corteza prefrontal, que es uno de los tejidos más afectados en la esquizofrenia, es una zona también implicada en la neurotransmisión dopaminérgica, por lo que no puede descartarse que el ER β ejerza alguna función reguladora sobre dicha función, que estaría modificada en los animales tratados con LPS prenatal y que podría influir posteriormente en las vías de señalización reguladas por estradiol e IGF-1. Por otro lado, hay evidencias de una actividad apoptótica anormal en cerebro en esquizofrénicos (Wood y cols., 2009; Barnes y cols., 2011; Chen y cols 2009; Glantz y cols, 2010) y en modelos animales de esquizofrenia (Anastasio y cols, 2009; Abekawa y cols, 2011). Puesto que el receptor de estrógenos β es inductor de apoptosis en células neuronales (Nilsen y cols, 2000), sus mayores niveles en los animales tratados con LPS podrían estar relacionados con algún defecto en apoptosis.

Las ratas tratadas con LPS prenatalmente tienen niveles alterados de P-AKT en corteza, y de GSK3/P-GSK3 en cerebelo

Discusión

La señalización por Akt y GSK3, que como hemos visto puede depender del IGF-1 y del estradiol, está alterada en esquizofrenia (Emamian y cols., 2004). La GSK3, cuya actividad está regulada por Akt, es una proteína esencial para el desarrollo y para la neuroprotección en animales adultos y acerca de la cual se han reportado anomalías en pacientes con esquizofrenia: muchas de las alteraciones genéticas presentes en esta enfermedad, están en genes relacionados con su regulación (revisado por Lovestone y cols., 2007). Asimismo fármacos antipsicóticos como la clozapina o el haloperidol regulan su actividad aumentando su fosforilación y por tanto inhibiéndola (Kang y cols., 2004; Li y cols., 2007; Emamian y cols., 2004). Por estos motivos consideramos importante analizar la ruta Akt/GSK3 en nuestro modelo de LPS prenatal.

En corteza y en hipotálamo, observamos una mayor fosforilación de Akt, lo que sugeriría una mayor actividad de esta quinasa, en los animales tratados con LPS. Se ha demostrado, que DISC-1, que es uno de los principales genes relacionados con la esquizofrenia (Chubb y cols., 2007) regula directamente la actividad de Akt y que uno de los principales defectos asociados a una alteración en DISC-1 es precisamente una sobreactivación de Akt (Kim y cols., 2009), lo cual es congruente con nuestros datos en los animales tratados con LPS prenatalmente.

Pese a que la actividad de Akt está relacionada con efectos neuroprotectores (Garcia-Segura y cols., 2010) en nuestro caso podría sugerir más bien un defecto en la remodelación sináptica. Tras la pubertad, se sabe que hay una disminución del número de sinapsis (Gogtay y cols., 2004). Asimismo se ha detectado que durante la adolescencia se incrementa la muerte celular en la corteza visual en ratas hembras (Nuñez y cols., 2001) y entre los días 35 y 90 de vida disminuye la cantidad de neuronas en la corteza prefrontal (Markham y cols., 2007). El periodo de tiempo mencionado en el último caso coincide con la edad de nuestras ratas, 2 meses, por lo que esta mayor activación de Akt podría sugerir un incipiente defecto en la remodelación necesaria en el cerebro tras la pubertad en los animales tratados con LPS prenatal. En pacientes esquizofrénicos asimismo, Jones demostró en 1995 que existe una disminución en el número de neuronas en la sustancia blanca superficial de corteza del lóbulo temporal y frontal, mientras que hay un exceso de estas en la sustancia blanca más profunda, sugiriendo una alteración en la migración

Discusión

neuronal. Este defecto se ha relacionado con la formación de conexiones anómalas que podrían contribuir a los síntomas negativos de la esquizofrenia (Jones, 1995). En consonancia con el estudio de Jones, en un estudio en un modelo de esquizofrenia en ratones *knockout* para la fosfolipasa C- β 1, se demostró que estos animales, tienen una mayor neurogénesis y una migración anormal de neuronas granulares (Manning y cols., 2010). En conclusión, parece que en la esquizofrenia y en varios modelos de esta enfermedad en roedores, se observan defectos tanto en neurogénesis como en apoptosis y en migración celular, que contribuyen a que la formación de circuitos sinápticos resulte defectuosa. Quizá las diferencias que encontramos en la fosforilación de Akt en las ratas tratadas con LPS podrían estar relacionadas con estas alteraciones, aunque serían necesarios más estudios para comprobarlo.

Respecto a GSK3, nuestros resultados indican una disminución en los niveles totales de esta proteína en hipotálamo y cerebelo, lo cual va acompañado, en el cerebelo, de unos menores niveles de GSK3 fosforilada, lo cual sugiere una mayor activación. La GSK3, además de estar regulada por la ruta de PI3K/Akt, también está regulada por la vía de Wnt (Lovestone y cols., 2007), la cual juega un papel esencial en el desarrollo del sistema nervioso (Moon y cols., 1997). Como comentábamos anteriormente, se han descrito alteraciones en la regulación de GSK3 en esquizofrenia y otras enfermedades (Jope y cols., 2006). En el estudio de Li en 2007, se descubrió que en ratones tratados con risperidona se producía un aumento de la fosforilación de GSK3 en cerebelo (Li y cols., 2007). En otro estudio se observó que ratones transgénicos que tenían un defecto en la fosforilación de Ser-9 en GSK3 (y por tanto, la proteína estaba activa constitutivamente) poseían varios defectos relacionados con la esquizofrenia, como déficits en tests de memoria y aprendizaje y defectos en la potenciación a largo plazo (Dewachter y cols., 2009). Nuestros datos, mostrando modificaciones en los niveles y en la fosforilación de GSK3 en un modelo de esquizofrenia, están de acuerdo con estos estudios previos.

Discusión

El LPS prenatal produce alteraciones en la vía de la MAPK en cerebelo

También descubrimos niveles anormales de ERK1 y ERK1 fosforilada en el cerebelo de animales tratados prenatalmente con LPS. El hecho de que los animales tratados prenatalmente con LPS tuvieran una menor activación de ERK1 podría explicar la sobreproducción de proteína total, como mecanismo de compensación. La vía de la MAPK, a la cual pertenecen ERK1 y 2, constituye otra vía regulada por estradiol y es esencial para el desarrollo y la supervivencia neuronal (Lebesgue y cols., 2009). Esta vía, regula de forma directa al factor de transcripción CREB, para el cual se ha descrito un papel en memoria y aprendizaje, basado en su capacidad de modular la expresión de una gran cantidad de genes implicados en plasticidad sináptica (Carlezon y cols., 2005). Entre sus mecanismos de actuación, CREB incrementa la transcripción de genes relacionados con morfogénesis (Zhao y cols., 2005) y las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 (Nilsen y Brinton, 2003b) y Bcl-xl (Pike, 1999). El hecho de que en cerebelo encontremos una menor actividad de ERK1, podría implicar anomalías en la señalización en la vía de la MAPK, que podrían estar relacionada con defectos conductuales, como el que analizaremos posteriormente en el experimento de reconocimiento de objetos. Por otro lado, examinando los resultados en ERK1 y GSK3 sería coherente pensar que la disminución en la activación de ERK1, esté relacionada con la disminución en la fosforilación de GSK3, puesto que se ha descrito que ERK es capaz de fosforilar a GSK3 β (Sutherland y cols., 1993; Saito y cols., 1994), de forma que una menor actividad en ERK podría causar una menor fosforilación, y por ende una mayor activación de GSK3.

En los últimos años, han surgido evidencias del importante papel del cerebelo en la esquizofrenia, especialmente en síntomas cognitivos puesto que además de su funciones puramente motoras, se sabe que el cerebelo está conectado a varias regiones de la corteza y que puede modular aspectos clave de la actividad cortical (revisado por Andreasen y Pierson, 2008). En pacientes esquizofrénicos existe una disminución de proteínas sinápticas en cerebelo (Thorne y cols., 2007) y en un estudio se descubrió que la disminución en el tamaño del cerebelo de esquizofrénicos, respecto a personas sanas, se correlacionaba con la gravedad de síntomas (Wassink y cols., 1999). Al menos en un estudio de infección prenatal en animales, se han encontrado también anormalidades en el cerebelo: ratones tratados prenatalmente con poli I:C o con el virus de la gripe presentan

una menor cantidad de células de Purkinje en el cerebelo (Shi y cols., 2009). Quizá nuestros resultados en GSK-3 y ERK1/2 pudieran estar relacionados con el mecanismo por el que se producen estas diferencias en el cerebelo en la esquizofrenia

5. Efecto del LPS prenatal, el género, la privación de hormonas gonadales y el tratamiento con estradiol, progesterona, tamoxifeno o raloxifeno en el reconocimiento de objetos

Las ratas macho tratadas con LPS prenatal muestran un déficit en reconocimiento de objetos

El test de reconocimiento de objetos, ha sido utilizado ampliamente para evaluar deterioro cognitivo en modelos de esquizofrenia, debido a que al no requerir un entrenamiento especial y no realizarse en condiciones estresantes (como podría ser el Morris Water Maze) se asemeja más a las condiciones de los tests de deterioro cognitivo en seres humanos (Ennaceur y Delacour, 1988).

El tratamiento con antagonistas de los receptores glutamatérgicos NMDA como fenciclidina (Hasimoto y cols, 2005; Vigano y cols, 2009), o MK-801 (De Lima y cols., 2005) se consideran modelos de ciertos síntomas de la esquizofrenia puesto que inducen déficits en la inhibición prepulso, y también producen deterioros en el test de reconocimiento de objetos. Otros modelos farmacológicos como el de tratamiento con metaanfetamina, que induce neurotoxicidad en terminales dopaminérgicas, o el tratamiento con 8-OH-DPAT, un agonista de los receptores 5HT1A, también producen déficits en inhibición prepulso (Gogos y cols, 2004) y deterioros en el reconocimiento de objetos (Mizoguchi y cols, 2008; Pitsikas y cols, 2005). Además de los modelos farmacológicos, existen modelos de neurodesarrollo defectuoso debido a estrés prenatal, o a procesos inflamatorios durante la gestación. Un ejemplo es el modelo de estrés prenatal variable (Markham y cols, 2010), que induce una peor ejecución en el test de reconocimiento de objetos junto a otros déficits asociados a la esquizofrenia. Nuestro modelo por inyección prenatal de LPS constituiría un ejemplo de modelo de neurodesarrollo defectuoso por infección prenatal.

Discusión

Nuestros resultados indican que las ratas macho inyectadas prenatalmente con LPS muestran un deterioro en el reconocimiento de objetos, ya que se puede observar un menor índice de discriminación comparadas con las ratas control (ratas tratadas prenatalmente con salino). Las ratas macho tratadas con LPS también mostraron una menor locomoción en la primera fase del test, pero esta menor locomoción no tuvo influencias en el tiempo de exploración de los objetos en ningún caso. Por tanto, el deterioro en el reconocimiento de objetos no es achacable a una menor exploración por parte de las ratas LPS, puesto que los tiempos de exploración en ambas fases del test no difirieron de las ratas control. Este resultado es congruente con lo descrito en otros modelos de esquizofrenia, como los comentados anteriormente, donde animales tratados con determinadas sustancias o estrés prenatal muestran deterioros en este test.

Hasta donde llega nuestro conocimiento, no existen estudios donde se haya realizado el test de reconocimiento de objetos en el modelo de LPS prenatal. Sin embargo existe un estudio en el que se trataron prenatalmente ratones con poli (I:C), que constituye un análogo de infección por virus. La progenie tratada con poli (I:C) mostró un mayor reconocimiento de objetos que sus controles (Ito y cols, 2010), pero en otros estudios con modelos similares ocurrió lo contrario (Ozawa y cols, 2006; Ibi y cols, 2009); igual que en nuestro caso, ratas sometidas a inflamación pre o neo natal mostraron deterioro en este tipo de memoria.

Las ratas hembras tratadas con LPS prenatal, a diferencia de los machos, no muestran ningún defecto en el reconocimiento de objetos

La esquizofrenia es una enfermedad con un marcado dimorfismo sexual, motivo por el cual nos interesó realizar el test también en ratas hembra tratadas prenatalmente con LPS. A diferencia de las ratas macho, las hembras tratadas con LPS no mostraron ninguna diferencia con las hembras control en el índice de reconocimiento de objetos, ni en ningún otro parámetro del test. Debido a esta diferencia nos interesó realizar también la comparación entre machos y hembras, con el resultado de que en animales tratados prenatalmente con salino, las ratas macho mostraron un mayor índice de reconocimiento que las hembras. Sin embargo, las ratas macho tratadas prenatalmente con LPS mostraron

Discusión

un deterioro significativo en índice de reconocimiento respecto a las ratas machos y hembras tratadas prenatalmente con salino.

En estudios con distintas cepas de ratas no tratadas, incluida la Wistar, se ha observado que los machos muestran un mayor reconocimiento que las hembras (Ceccarelli y cols, 2001; Ennaceur y cols, 2005), lo cual coincide con nuestros resultados. En cambio en las ratas tratadas prenatalmente con LPS, se observa un claro dimorfismo sexual, puesto que el tratamiento no tuvo ningún efecto en las hembras mientras que en los machos si que produjo un deterioro. En este sentido, es interesante destacar que en la esquizofrenia las mujeres suelen presentar menos síntomas negativos y cognitivos que los hombres (Goldstein y cols 1988).

La privación de hormonas gonadales por gonadectomía deteriora el reconocimiento de objetos sólo en ratas macho.

Las hormonas gonadales juegan un papel importante en la regulación de los procesos cognitivos (Dere y cols, 2007), por lo que los resultados anteriores nos sugirieron la hipótesis de que quizás el estradiol y/o la progesterona podían estar ejerciendo un papel protector en las hembras tratadas prenatalmente con LPS, o bien que la testosterona podría tener un efecto negativo en este test en los machos. En este sentido, es interesante el estudio de Gogos en que demostró que el estradiol protegía del deterioro en inhibición prepulso producido por distintas drogas, mientras que la testosterona o no ejerció ningún efecto, o incluso empeoró el deterioro en inhibición prepulso causado por el MK-801, que es antagonista de los receptores NMDA (Gogos y cols., 2011). La testosterona, el estradiol y las progestinas (Foy y cols., 2001; Harley y cols, 2000) afectan la plasticidad sináptica en el hipocampo por sus efectos en la potenciación a largo plazo (LTP), aunque hay estudios que sugieren que la testosterona podría disminuirla mientras que el estradiol la aumenta (Harley y cols, 2000). Para comprobar nuestras hipótesis, repetimos el test de reconocimiento de objetos en ratas machos y hembras castradas e intactas, y con tratamiento con salino o LPS prenatal.

En las ratas macho, la castración disminuyó la actividad locomotora y los tiempos de exploración en ambas fases del test. También se observó que se mantuvo el efecto negativo del LPS prenatal en el reconocimiento de objetos y los machos salino orquidectomizados mostraron un deterioro en el reconocimiento de objetos respecto a

Discusión

machos salinos intactos, por lo que la privación de testosterona mediante la castración ejerció más bien un efecto negativo sobre la ejecución del test. Sin embargo, puesto que la castración también disminuyó los tiempos de exploración, no se puede descartar que la disminución en el reconocimiento de objetos se deba a una peor memorización debido al menor tiempo empleado explorando. En las ratas hembra, igual que en los machos, la castración disminuyó la actividad motora y los tiempos de exploración, sin embargo esto no redundó en un menor reconocimiento de objetos, que se siguió manteniendo en todos los casos en los niveles de las ratas control (tratadas prenatalmente con salino y sham). Respecto a la actividad motora era de esperar su disminución debido a la castración en machos y hembras, puesto que hace años ya que se sabe que el estradiol y la testosterona aumentan esta actividad (Beatty, 1979)

A pesar de estudios como el de Harley (Harley y cols, 2000) que sugieren que la testosterona podría disminuir la plasticidad sináptica, hay otros estudios que demuestran un papel facilitador de la testosterona en tareas cognitivas, puesto que ratas privadas de esta por castración muestran un peor desempeño en tareas de aprendizaje y memoria y a su vez el tratamiento con testosterona facilita las mismas tareas cognitivas (Frye y Seliga, 2001; Frye y Lacey 2001; Kritzer y cols, 2001; Spritzer y cols, 2008). Respecto a las ratas hembra, hay una cierta controversia respecto al papel del estradiol: Sutcliffe demostró que el momento del ciclo estral en ratas *hooded* Wistar no tenía influencia sobre el reconocimiento de objetos, cuando el tiempo entre la primera fase del test y la segunda fase fue de 1 hora (Sutcliffe y cols, 2007), pero en el estudio de Walf en 2006, sí se encontró un mejor desempeño en la misma tarea en ratas Long Evans, cuando estas estaban en estro (Walf y cols, 2006). Quizá la diferencia entre ambos estudios se deba a que en el estudio de Walf, el tiempo de retraso entre la primera y segunda fase fue de 4 horas, mientras que en el de Sutcliffe fue sólo una hora, además de que en cada estudio se utilizaron distintas cepas que podrían tener también distinta sensibilidad al estradiol.

También ha sido demostrado que el tratamiento con estradiol mejora la ejecución en reconocimiento de objetos en ratas y ratones (Fernandez y Frick, 2004; Gresack and Frick, 2004; Li y cols., 2004; Papalexi y cols, 2005). Sin embargo, a pesar de que el tratamiento con estradiol facilita las tareas cognitivas, eso no se traduce necesariamente en que la ovariectomía induzca un déficit en el test de reconocimiento de objetos como demuestra Vaucher en su trabajo con ratones C57/BL6 (Vaucher y cols, 2002). En otro

Discusión

estudio, a diferencia del nuestro, sí se observó que la ovariectomía deterioraba el reconocimiento de objetos en ratas (Wallace y cols, 2006), pero esto fue cuando se midió el reconocimiento 4 horas después de la primera fase del test. En nuestro caso lo medimos 1 hora después, por lo que podríamos considerar que a este tiempo, la privación hormonal en hembras no afecta al reconocimiento de objetos.

No hemos encontrado, hasta la fecha, estudios de infección prenatal que comparen ratas machos y hembras en tests cognitivos. Sin embargo, en otros modelos de esquizofrenia basados en un neurodesarrollo perinatal defectuoso inducido por estrés prenatal variable (Markham y cols, 2010) o por inhibición de la síntesis de glutatión (Castagné y cols, 2004) sí se ha observado que las ratas macho presentan un deterioro en el reconocimiento de objetos respecto a las control, mientras que en las hembras no hay ninguna diferencia. Respecto al último estudio, es relevante el hecho de que precisamente uno de los efectos del LPS prenatal es la disminución de glutatión en la placenta (Zhang y cols, 2007), con la consecuencia de un mayor estrés oxidativo para los embriones, que sido descrito como uno de los mecanismos que contribuyen a los efectos de la infección prenatal (Boksa, 2010). Como sugiere el trabajo de Lanté, parece que los fetos femeninos están protegidos del aumento del estrés oxidativo inducido por el LPS y no muestran ningún defecto conductual de adultas, mientras que en machos sí hay efecto del estrés oxidativo que se correlaciona con un deterioro en un test de reconocimiento espacial (Lanté y cols, 2007)

Los resultados del experimento de reconocimiento de objetos en ratas castradas, también sugieren que la aparente protección que disfrutaban las hembras LPS frente a los machos, no se debe a un efecto beneficioso del estradiol y/o la progesterona circulantes, puesto que en ese caso la privación hormonal por gonadectomía habría hecho emerger un deterioro en las hembras LPS. Siguiendo el mismo razonamiento, tampoco es probable que se deba a un efecto pernicioso de la testosterona, ya que por el contrario hemos observado que la falta de testosterona debida a la castración deteriora el índice de reconocimiento en las ratas control. Actualmente, pese a que se empiezan a conocer posibles mecanismos por los que la infección prenatal induce defectos en el desarrollo del sistema nervioso, aún no tenemos datos que aclaren porqué motivo durante el desarrollo embrionario y fetal, las hembras son menos susceptibles a los efectos del LPS prenatal.

Discusión

El tratamiento con estradiol, progesterona, y los SERMs tamoxifeno y raloxifeno revierten el déficit observado en reconocimiento de objetos en ratas machos tratadas prenatalmente con LPS

Puesto que el estradiol ha demostrado poseer propiedades pro cognitivas, como comentábamos anteriormente, en el siguiente experimento nos planteamos estudiar si un tratamiento previo con estradiol podría revertir el efecto del LPS prenatal en reconocimiento de objetos. Asimismo, también testamos la progesterona ya que ha demostrado favorecer el reconocimiento de objetos en ratas hembra ovariectomizadas (Walf y cols, 2006). Añadimos por último dos grupos más tratados con tamoxifeno y raloxifeno. Ambos SERMs han demostrado poseer propiedades neuroprotectoras (Arevalo y cols, 2011) y revertir los déficits inducidos por la orquidectomía en una tarea cognitiva dependiente de hipocampo (Lagunas y cols, 2011).

Todos los tratamientos revirtieron el déficit observado en actividad locomotora en ratas LPS. Como habíamos comentado, el estradiol posee propiedades activadoras en este sentido (Beatty, 1979), aunque dichos efectos no se han encontrado con la progesterona (Beatty 1979; Lightfoot, 2008). En nuestros resultados el grupo LPS tratado con progesterona no difiere en su actividad locomotora del control, sin embargo sí se puede apreciar que en realidad sus niveles son prácticamente los mismos que en los animales LPS no tratados con progesterona, mientras que en el resto de grupos tratados se encuentran bastante aumentados. Los SERMs tamoxifeno y raloxifeno aumentaron la actividad locomotora a unos niveles similares a los del control y a los del grupo tratado con estradiol, por lo que podemos asumir que sus efectos imitan al estradiol en este parámetro.

El déficit en el índice de reconocimiento en ratas LPS se vio revertido por todos los tratamientos. Se ha demostrado que la progesterona, el estradiol, la testosterona y sus metabolitos facilitan la tarea de reconocimiento de objetos en roedores (Frye y Lacey, 2001; Gresack y Frick, 2006; Walf y cols, 2006). Respecto a los mecanismos sabemos que tanto progesterona como estradiol juegan un papel en la sinaptogénesis y la plasticidad sináptica en el hipocampo (Foy, 2001), que junto a la corteza entorrinal, ha sido implicada en el reconocimiento de objetos (Dere y cols, 2007).

Nuestros resultados están en la misma línea que otro estudio, en el que ratas ovariectomizadas tratadas con progesterona mostraron un mejor reconocimiento de objetos

Discusión

(Walf y cols, 2006). La progesterona es un potente regulador de los receptores GABA_A, mediante su conversión en allopregnenolona (Mellon y Griffin 2002; Paul y Purdy, 1992; Rupprecht, 2003) y se ha descrito que estos receptores son relevantes para un correcto desempeño en el test de reconocimiento de objetos, puesto que una disminución en la neurotransmisión GABAérgica conduce a deterioros en este test (Ma y cols, 2001; Hu y cols, 2004).

Respecto al estradiol, se ha sugerido que el mecanismo por el que favorece la cognición en modelos animales es a través del receptor de estrógenos beta, ya que se ha observado que el tratamiento con ligandos selectivos de este receptor mejora el desempeño en tests cognitivos (Lagunas y cols, 2011; Liu y cols, 2008; Rhodes and Frye, 2006). Además, el estradiol tiene un importante papel regulador de numerosos sistemas de neurotransmisión que son relevantes para el reconocimiento de objetos y que se encuentran alterados en la esquizofrenia, como por ejemplo el glutamato y la dopamina (Dere y cols, 2006; Carlsson, 1997)

Al igual que el estradiol, sabemos que los SERMs tamoxifeno y raloxifeno, tienen propiedades neuroprotectoras y antiinflamatorias en el sistema nervioso (Arevalo y cols, 2011; Ciriza y cols., 2004; Tapia-Gonzalez y cols., 2008; Barreto y cols; 2009). El raloxifeno ha mostrado mejorar la cognición en un estudio en hombres mayores y sanos sometidos a un tratamiento crónico (Goekoop y cols, 2005) aunque en otro estudio en mujeres postmenopáusicas no se observó ningún efecto (Nickelsen y cols, 1999). El tamoxifeno ha demostrado poseer actividad terapéutica en trastornos maniacos y del estado de ánimo (Pereira y cols., 2011). En animales, un estudio reciente de nuestro laboratorio demostró un efecto beneficioso de ambos SERMs en una tarea dependiente de hipocampo en ratas macho orquidectomizadas (Lagunas y cols, 2011). Aunque no hay estudios respecto a los mecanismos implicados en el papel en cognición de estos SERMs, sí sabemos que en el cerebro de rata modulan, de una forma muy similar a como lo hace el estradiol, los receptores de glutamato AMPA y NMDA, que como comentábamos previamente tienen un papel esencial en el reconocimiento de objetos. (Cyr y cols, 2001a; Cyr y cols., 2001b). Además, en un estudio de infección prenatal por LPS, se descubrió que en las ratas macho adultas, pero no en las hembras, había un defecto en las corrientes inducidas por NMDA y la potenciación a largo plazo en la región CA1 del hipocampo, que se correlaciona con peores ejecuciones en el laberinto acuático (Lante y cols., 2007).

De todas formas, también es importante resaltar, que en nuestro experimento, tanto el tamoxifeno como el raloxifeno aumentaron significativamente el tiempo de exploración en la primera fase del test, por lo que no podemos descartar que su papel no sea sólo cognitivo, ya que la mejora que inducen en el reconocimiento de objetos también podría deberse simplemente a que facilitaron la memorización de los objetos al aumentar el tiempo de exploración de estos.

6. Efecto del LPS prenatal, el género, el estradiol y la privación de hormonas gonadales ováricas en la inhibición prepulso

El LPS prenatal en ratas macho induce un deterioro en la inhibición prepulso a la intensidad de prepulso de 3 dB, el cual es corregido por el estradiol.

En los modelos de infección prenatal, la principal alteración descrita en el comportamiento de los roedores adultos, es en la inhibición prepulso. Esta alteración se produce tanto en modelos de inyección prenatal de LPS, que imita los efectos de una infección bacteriana (Borrell y cols., 2002; Romero y cols., 2007; Fortier y cols., 2007) como en modelos de inyección prenatal de poli I:C, que mimetiza la respuesta inmune por infección vírica (Wolff y Bilkey, 2008). La inhibición prepulso es una prueba clave para cualquier modelo de esquizofrenia, ya que representa la capacidad de filtrado sensorial, que en pacientes con esquizofrenia está alterada (Braff y cols., 1978; Kumari y cols. 1999). Además se ha demostrado que se pueden revertir deterioros en esta prueba mediante el tratamiento con antipsicóticos, tanto en humanos, como en modelos animales (Kumari y cols. 1999; Romero y cols., 2007).

En el modelo que hemos utilizado de LPS prenatal (Romero y cols., 2007) se ha descrito un dimorfismo sexual en la inhibición prepulso: cuando las ratas tratadas prenatalmente con LPS tienen dos meses de edad se observa un deterioro en la inhibición prepulso en los machos pero no en las hembras. El estradiol ha demostrado disminuir los síntomas de la esquizofrenia en hombres y mujeres sometidos a tratamiento con antipsicóticos (Kulkarni y cols., 2002; 2011) por lo que consideramos interesante comprobar en nuestro modelo si el tratamiento con estradiol podía disminuir los defectos en la inhibición prepulso en ratas macho tratadas prenatalmente con LPS y si la privación de hormonas gonadales por ovariectomía, podría inducir algún defecto en las ratas hembras tratadas prenatalmente con LPS que pudiera ser revertido por el estradiol.

Discusión

Sorprendentemente, en nuestras manos, los machos LPS no mostraron aparentemente defectos globales en la inhibición prepulso en contra de lo que esperábamos. Sólo mostraron una disminución significativa en la inhibición prepulso para el prepulso de menor intensidad (3 decibelios) y esta diferencia con las ratas control desapareció en los machos LPS tratados con estradiol. Se ha descrito que el estradiol tiene un efecto facilitador de la inhibición prepulso en ratas (Van den Buuse y Eikelis, 2001; Gogos y Van den Buuse, 2004) y en humanos (Gogos y cols., 2005) lo que podría explicar este efecto. La razón por la cual nuestras ratas no se comportaron de la misma forma que en otros estudios podría deberse a diferencias metodológicas. En primer lugar, hay que considerar la variabilidad individual en la susceptibilidad de las ratas preñadas a los efectos del LPS, puesto que en un estudio de infección prenatal donde los resultados en la progenie eran variables, se procedió a seleccionar sólo las ratas preñadas que mostraban fiebre en respuesta al LPS y entonces empezaron a observarse resultados consistentes en la progenie. (Lowe y cols., 2008). También es posible que la pauta diaria de tratamiento con LPS no fuera plenamente eficaz, puesto que se ha descrito que los tratamientos repetidos con endotoxina inducen el desarrollo de tolerancia (West y Heagy, 2002). No obstante, hay que destacar que en otro estudio de infección prenatal por LPS con una pauta de tratamiento distinta a la nuestra (Fortier y cols., 2004) tampoco se encontraron diferencias en la inhibición prepulso.

El LPS prenatal, la ovariectomía y el tratamiento con estradiol no tienen ningún efecto en las ratas hembra.

En las ratas hembras tratadas prenatalmente con LPS no se observó ningún cambio en la inhibición prepulso respecto a las tratadas prenatalmente con salino. Este resultado sí es consistente con lo que se ha descrito anteriormente para los dos meses de edad (Borrell y cols., 2002), en que las hembras LPS no muestran ningún defecto en inhibición prepulso. Asimismo, los defectos en inhibición prepulso en pacientes humanos, que se han relacionado con los síntomas cognitivos de la esquizofrenia (Castagné y cols., 2009), suelen ser más frecuentes y graves en hombres que en mujeres (Goldstein y Link, 1988). La ovariectomía tampoco indujo ningún efecto en la inhibición prepulso ni en ratas controles (tratadas prenatalmente con salino) ni en ratas tratadas prenatalmente con LPS. En otros estudios se ha demostrado que la ovariectomía no afecta a la inhibición prepulso en ratas adultas ni 1 semana antes, ni 3 meses antes de la realización del experimento (Van

den Buuse y Eikelis, 2001; Vaillancourt y cols., 2002), por lo que nuestros resultados en ratas tratadas prenatalmente con salino son congruentes con los mencionados. Además, en nuestro caso la ovariectomía se realizó con 1 mes de edad, siendo por tanto prepuberal, por lo que podemos concluir que la influencia del estradiol en la configuración de los circuitos necesarios para el procesamiento sensorial en ratas hembra, se produce en algún momento anterior a la pubertad. Respecto a las hembras LPS, observamos que de nuevo no difieren de las hembras salino, manteniéndose así el dimorfismo sexual descrito por Borrell (Borrell y cols., 2002).

El tratamiento con estradiol no tuvo tampoco ningún efecto, como sucede en el trabajo de Vaillancourt (Vaillancourt y cols., 2002) y a diferencia del estudio de Van den Buuse (Van den Buuse y Eikelis, 2001) en que sí se observa un efecto de tratamiento agudo con estradiol a dosis que iban de 10 a 250µg/kg. Las discrepancias entre este estudio y el nuestro pueden deberse a diferencias en el protocolo de inhibición prepulso utilizado, puesto que determinados efectos pueden hacerse evidentes a unas intensidades de prepulso y no a otras, como sucede en el caso de Van der Buuse, que con un tratamiento con estradiol 30 minutos antes del test, sólo observa un efecto del estradiol a las intensidades más altas. Por tanto, parece que el tratamiento agudo con estradiol sólo afecta a la inhibición prepulso en determinadas condiciones, caso que no es el nuestro.

7. Efecto del LPS prenatal, el género, el estradiol y la privación de hormonas gonadales ováricas sobre respuesta a anfetamina y actividad dopaminérgica

Las ratas macho tratadas prenatalmente con LPS muestran una respuesta dopaminérgica disminuida, acompañada de un menor marcaje de TH en estriado y el estradiol la recupera a niveles normales.

Existen numerosas evidencias de que una de las principales características de la esquizofrenia es una regulación alterada de la actividad dopaminérgica, y a su vez esta alteración está directamente correlacionada con la expresión de síntomas positivos (Fortier y cols., 2004; Yui y cols., 1999; Laruelle y cols., 1996, 1999; Breier y cols, 1997; Abi-Dargham y cols., 1998; Laruelle and Abi-Dargham, 1999). La anfetamina incide directamente en la liberación de dopamina en estriado y núcleo accumbens (Castall y cols., 1977; Porrino y cols., 1984) y se ha demostrado que su administración empeora los síntomas en sujetos esquizofrénicos y su utilización crónica induce un estado similar al de

Discusión

la esquizofrenia en sujetos sanos (revisado por Yui y cols., 1999). Por ello la hiperlocomoción inducida por anfetamina se utiliza habitualmente como medida de respuesta dopaminérgica en modelos de esquizofrenia en animales (Castall y cols., 1977; Porrino y cols., 1984).

En la mayoría de los estudios de respuesta de hiperlocomoción a agentes liberadores de dopamina en modelos de inflamación prenatal se reporta un aumento en la hiperlocomoción en respuesta a anfetamina (Fortier y cols., 2004; Ozawa y cols., 2006; Meyer y cols., 2008). Estos estudios están realizados en animales macho. Hasta donde sabemos no existen trabajos en hembras ni que comparen ambos sexos. El aumento en respuesta dopaminérgica en estos modelos se correlaciona con un aumento en el número de neuronas dopaminérgicas mesencefálicas (Meyer y Feldon, 2009) y también mayores niveles de dopamina y sus metabolitos (Winter y cols., 2009).

Nuestros resultados, sin embargo, son totalmente opuestos a lo descrito. Las ratas macho tratadas prenatalmente con LPS presentan una menor respuesta de hiperlocomoción inducida por anfetamina que los machos tratados prenatalmente con salino. Una posible explicación se puede deducir a partir de estudios que también han relacionado la infección prenatal con un mayor riesgo de Parkinson (Ling y cols., 2002). Esta enfermedad se caracteriza por una pérdida progresiva de neuronas dopaminérgicas nigroestriatales que conlleva la aparición de síntomas motores (Bourque y cols., 2009), con lo cual sería lógico pensar que una menor cantidad de neuronas dopaminérgicas en áreas relevantes para este experimento, como el estriado, condujera a una menor respuesta. El grupo de Ling ha descrito precisamente que el tratamiento prenatal con LPS lleva a una disminución en neuronas dopaminérgicas (Ling y cols., 2002; Ling y cols., 2004; Ling y cols., 2009) en contraposición a los trabajos mencionados anteriormente (Meyer y cols., 2009) en que se describe un aumento en neuronas dopaminérgicas. En nuestro caso, nuestros resultados serían congruentes con los de Ling, ya que en la medida de TH observamos una disminución en estriado en las ratas macho tratadas con LPS, lo cual podría representar un menor número de neuronas dopaminérgicas en la substantia nigra que estuviera induciendo esa menor respuesta a anfetamina. En el caso del núcleo accumbens no se observan diferencias en TH, por lo que parece que la anomalía en la respuesta a anfetamina en nuestro modelo depende principalmente de la dopamina en estriado.

Discusión

En los trabajos de Ling se describe una disminución en neuronas dopaminérgicas, pero acompañado de un aumento de actividad dopaminérgica medida a través de sus metabolitos (Carvey y cols., 2003). Por lo tanto podríamos concluir que hay evidencias claras de que la infección prenatal produce alteraciones en las vías dopaminérgicas, pero estas alteraciones pueden ser en un sentido u otro, quizás dependiendo del tipo de tratamiento prenatal (dosis, tiempo, tipo de agente utilizado, etc) produciendo bien modelos de esquizofrenia, o modelos de Parkinson. En nuestro caso, parece que las ratas tratadas prenatalmente con LPS durante toda la gestación presentan características de ambos tipos, dados los resultados en reconocimiento de objetos, inhibición prepulso e hiperlocomoción inducida por anfetamina.

El tratamiento con estradiol, en nuestros experimentos, recupera una respuesta normal a anfetamina en machos LPS, pero no produce ningún efecto en núcleo accumbens ni en estriado en los niveles de TH. En los machos tratados prenatalmente con LPS los niveles de TH siguen por debajo de lo normal, mientras que en accumbens no cambian. Por tanto el mecanismo por el cual el estradiol está recuperando la respuesta dopaminérgica debe ser otro. El estradiol modula la expresión de receptores D2 en estriado y el transportador de membrana de dopamina (DAT) por lo que este sería un posible mecanismo (revisado por Morrissette y cols, 2008b).

El LPS prenatal no induce ningún defecto en la respuesta dopaminérgica en hembras, pero la ovariectomía sí lo hace independientemente del tratamiento prenatal. El tratamiento con estradiol revierte parcialmente el efecto de la ovariectomía sólo en ratas control.

En las ratas hembra no observamos ningún efecto del LPS prenatal en la respuesta de hiperlocomoción a anfetamina, es decir no se observa aparentemente ningún defecto en la respuesta dopaminérgica, lo que podemos interpretar como un ejemplo más de la menor susceptibilidad de las hembras a la inflamación prenatal. Asimismo, congruentemente con este resultado, tampoco se observa ninguna diferencia en los niveles de TH en estriado ni en el núcleo accumbens. Este efecto sexualmente dimórfico es congruente, puesto que se han descrito numerosas diferencias en la regulación dopaminérgica entre machos y hembras. El estradiol modula la transmisión dopaminérgica en varias de sus etapas y se han

Discusión

descubiertos efectos tanto pro-dopaminérgicos como anti-dopaminérgicos (Di Paolo, 1994), además se han reportado variaciones debidas al ciclo estral (Di Paolo, 1994; Becker, 1999).

En humanos, tanto en esquizofrenia como en Parkinson, se han detectado diferencias sexuales en el sentido de una mayor incidencia de ambas enfermedades, y una mayor gravedad en los síntomas en hombres, que en mujeres (Salem y Kring, 1998; Diamond y cols., 1990). Estas diferencias podrían deberse en parte a las diferencias de género existentes en la función dopaminérgica en el estriado y el accumbens. Por ejemplo, en las hembras se observa una mayor cantidad de receptores D2 en el estriado (Becker, 1999), lo que podría explicar la mayor liberación de dopamina en este sexo (Castner y cols., 1993). Esto es congruente con lo que observamos en nuestro estudio, ya que las hembras control (tratadas prenatalmente con salino) muestran mayor respuesta a anfetamina que los machos control. Además, las ratas hembra tratadas prenatalmente con LPS parecen estar protegidas del efecto de LPS prenatal sobre la respuesta dopaminérgica y los niveles de TH en estriado. Por otra parte, en primates se ha descrito que las hembras intactas tienen más densidad de células dopaminérgicas que los machos y que las hembras ovariectomizadas (Leranth y cols., 2000) y en roedores se ha observado que las hembras son menos susceptibles a lesiones nigroestriales por MPTP o anfetamina, que los machos (Wagner y cols., 1993; Miller y cols., 1998).

En hembras, la ovariectomía induce una disminución de la respuesta a anfetamina, y por tanto de la respuesta dopaminérgica en todos los grupos, independientemente de su condición prenatal. Este resultado está en consonancia con lo descrito: la ovariectomía induce una disminución en la liberación de dopamina que el estradiol corrige (Becker, 1990; Di Paolo y cols., 1985). Además del estradiol, la progesterona también está implicada en la respuesta dopaminérgica ya que se ha observado que aumenta los niveles de dopamina y sus metabolitos en estriado (Petitclerc y cols., 1995). Este efecto se ha observado con dosis fisiológicas de progesterona en primates y roedores (Di Paolo y cols., 1986).

En nuestro experimento, el estradiol corrige parcialmente la respuesta a anfetamina en ratas tratadas prenatalmente con salino, ya que aumenta su respuesta a anfetamina, pero en ningún caso restablece los niveles a los de las hembras sham. Tanto en hembras ovariectomizadas tratadas prenatalmente con salino, como en hembras ovariectomizadas

Discusión

tratadas prenatalmente con LPS, el estradiol aumenta los niveles de TH en el núcleo accumbens, por lo que el ligero aumento en respuesta a anfetamina que presentan las hembras salino ovx debe deberse a otro efecto del estradiol, como podría ser el aumento en el transportador de dopamina o DAT (Bosse y cols., 1997) o de la expresión de receptores de dopamina en estriado (Bosse y Di Paolo, 1995; Levesque y Di Paolo, 1993). En la literatura se describe que el tratamiento con estradiol sólo revierte los efectos de la ovariectomía, cuando ésta no es de larga duración (Levesque y cols, 1989; Bosse y Di Paolo, 1996). Puesto que en nuestro estudio la ovariectomía es prepuberal esto nos puede estar indicando que también hay una falta de respuesta en este caso, y las hormonas gonadales ováricas son imprescindibles durante la pubertad para un correcto funcionamiento posterior de la neurotransmisión dopaminérgica.

Como decíamos previamente, en nuestro estudio no observamos ningún efecto del estradiol sobre la hiperlocomoción inducida por anfetamina en las ratas ovariectomizadas que fueron tratadas prenatalmente con LPS. Por el contrario, el estradiol aumentó ligeramente la respuesta a anfetamina en las ratas ovariectomizadas que fueron tratadas prenatalmente con salino. Por ello, lo más relevante que observamos en las hembras tratadas prenatalmente con LPS, es que pese a que son aparentemente normales, en el momento en que se las priva de hormonas gonadales se vuelven más insensibles al tratamiento con estradiol. Esto tiene sentido, puesto que en esquizofrenia y Parkinson en humanos, pese a que como ya se ha comentado los hombres son más susceptibles, se produce un aumento considerable en la incidencia de estas enfermedades en mujeres en situaciones donde hay un descenso considerable en los niveles de progesterona y estradiol, como la menopausia natural o la histerectomía (Häfner, 2003; Benedetti y cols., 2001).

Las ratas macho tratadas con LPS prenatal muestran una expresión alterada de TH en respuesta a estradiol en la corteza prefrontal

La teoría dopaminérgica de la esquizofrenia relaciona esta enfermedad con alteraciones en la actividad dopaminérgica en corteza prefrontal, además de en estriado y accumbens (Durstewitz y Seamans, 2008). Se cree que una menor actividad dopaminérgica en el sistema mesocortical, está implicada en los síntomas negativos y cognitivos de la esquizofrenia (Weinberger, 1987). A su vez está hipoactividad estaría correlacionada con una sobreactivación dopaminérgica en áreas mesolímbicas, principalmente en el núcleo

Discusión

accumbens y el estriado (Deutch, 1992). Efectivamente, en un modelo de lesión de la vía mesocortical en rodadores, se descubrió que estaba potenciada la respuesta sináptica en la vía mesolímbica, especialmente en el núcleo accumbens (Pycock y cols, 1980). Por este motivo, consideramos interesante analizar la expresión de TH también en corteza prefrontal, como índice de la actividad dopaminérgica, para determinar si estaba afectado por el LPS prenatal, el tratamiento con estradiol o la privación de hormonas gonadales por ovariectomía.

En las ratas macho tratadas prenatalmente con LPS no observamos ninguna diferencia en los niveles de TH con respecto a las ratas tratadas prenatalmente con salino. Sin embargo, el tratamiento con estradiol indujo una disminución en los niveles de TH sólo en los machos tratados prenatalmente con LPS sin afectar a los controles tratados prenatalmente con salino. En un modelo de esquizofrenia en ratones genéticamente modificados, se descubrió que estos tenían menor marcaje para TH en fibras de la corteza prefrontal que los ratones silvestres (Sekiguchia, 2011), lo que llevaría a pensar que una disminución en los niveles de TH es negativa. Esto no sería congruente con nuestro resultado de que el estradiol induce una disminución de los niveles de TH y nuestra hipótesis de que el estradiol puede tener efectos protectores en la esquizofrenia. Sin embargo, si interpretamos estos resultados teniendo en cuenta que en la prueba de hiperlocomoción inducida por anfetamina, el fenotipo de las ratas LPS es más similar al Parkinson que a la esquizofrenia, este resultado tiene más sentido. El estradiol no aumenta los niveles de TH en estriado ni en el núcleo accumbens de machos LPS, pero sin embargo sí que aumenta la hiperlocomoción inducida por anfetamina, lo que significa que el estradiol está aumentando la respuesta dopaminérgica en estas áreas, aunque por un mecanismo independiente de los niveles de TH. Como comentábamos, la regulación dopaminérgica de la corteza prefrontal por un lado, y del estriado y el accumbens por otro, está interconectada, de forma que una disminución de la actividad dopaminérgica en la corteza prefrontal resulta en un aumento de dicha actividad en el estriado y el accumbens (Durstewitz y Seamans, 2008). Por lo tanto, la disminución en los niveles de TH en la corteza de los machos LPS podría ser un posible mecanismo indirecto por el cual el estradiol estaría aumentando la respuesta a la anfetamina. Por otro lado, se ha demostrado que la privación de testosterona por gonadectomía incrementa los niveles de TH en la corteza prefrontal y se ha sugerido que este efecto podría estar mediado por la conversión

Discusión

de testosterona a estradiol (Adler y cols., 1999), por lo que tendría sentido pensar que si la falta de estradiol incrementa los niveles de TH, el tratamiento agudo con estradiol lo disminuya. El estradiol podría disminuir los niveles de TH en los machos LPS a través del receptor de estrógenos β , que regula mecanismos de apoptosis (Nilsen y cols, 2000), puesto que en anteriores experimentos de esta tesis (ver capítulo de Resultados, apartado 2.1) descubrimos que los machos tratados prenatalmente con LPS tenían una mayor expresión del receptor de estrógeno β que los controles en corteza prefrontal, lo cual también podría explicar la falta de respuesta de los controles al estradiol en la expresión de TH.

El LPS prenatal y la ovariectomía no afectan a la expresión de TH en corteza prefrontal en ratas hembra, sin embargo el estradiol induce un aumento de TH en ratas hembra control

En las hembras, el tratamiento prenatal con LPS no tuvo ningún efecto sobre los niveles de TH en la corteza prefrontal. Tampoco lo tuvo la ovariectomía. Sin embargo, el tratamiento con estradiol indujo una elevación en los niveles de TH, pero sólo en las hembras ovariectomizadas tratadas con salino, es decir, las hembras LPS resultaron totalmente insensibles al tratamiento con estradiol en este parámetro. En un estudio se observó que el estradiol produce un descenso en los niveles de dopamina en la corteza prefrontal de ratas ovariectomizadas (DuPont, 1981). Sin embargo, en dicho estudio, el tratamiento con estradiol fue crónico, a diferencia del nuestro que es agudo, y la ovariectomía fue realizada en ratas adultas, mientras que en nuestro caso es prepuberal. Además en el estudio de Du Pont se midió directamente dopamina, mientras que nosotros medimos TH, así que sería posible que la ovariectomía indujera un descenso en dopamina por otro mecanismo distinto al de la regulación de TH.

Si comparamos estos resultados con los obtenidos en machos, vemos un efecto opuesto del tratamiento con estradiol: mientras en los machos el estradiol induce una disminución en TH, en las hembras induce un aumento sustancioso. Esto puede ser achacable al dimorfismo sexual existente en la neurotransmisión dopaminérgica en la corteza prefrontal, ya que se ha descrito que las hembras poseen mayores niveles de dopamina, mientras que los machos presentan mayores niveles de sus metabolitos (Duchesne y cols., 2009). Un posible mecanismo para los efectos opuestos del estradiol en

machos y hembras, podría ser a través de su acción en los receptores de estrógeno, ya que Kritzer y su equipo descubrieron que en machos existe una mayor proporción de receptor de estrógenos β en las proyecciones mesocorticales, mientras que en hembras hay más proporción de receptor de estrógenos α (Kritzer y cols., 2008).

Respecto a las hembras ovariectomizadas y tratadas prenatalmente con LPS, vemos que presentan una falta absoluta de respuesta al estradiol, comparadas con las hembras ovariectomizadas y tratadas prenatalmente con salino. Hasta donde llega nuestro conocimiento no existe ningún estudio similar con el que podamos comparar nuestros resultados. Este dato puede sugerir una falta de adaptación a la privación de hormonas gonadales en las hembras LPS. En este sentido sería interesante realizar el mismo estudio en ratas gonadalmente intactas, ya que no es posible determinar si la falta de respuesta de las hembras LPS se debe a una mayor sensibilidad a la ovariectomía o a una falta de respuesta al estradiol en la regulación de TH, independientemente de la ovariectomía.

8. Efecto del LPS prenatal, el género, el estradiol y la privación de hormonas gonadales ováricas sobre marcadores de inflamación

Las ratas macho tratadas con LPS prenatal presentan mayores niveles plasmáticos de TNF α que los controles y este aumento es revertido por el estradiol

El TNF α es una de las principales citoquinas proinflamatorias que se generan en respuesta a LPS. En infección prenatal se ha demostrado que se genera junto a IL-1 e IL-6 en grandes cantidades en el suero de la madre (Fortier y cols., 2004; Gayle y cols., 2004) y también se ha detectado su expresión en el cerebro fetal y en la placenta (Gayle y cols., 2004; Cai y cols., 2000; Paintlia y cols., 2004; Liverman y cols., 2006; Urakubo y cols., 2001). Las citoquinas tienen efectos en la supervivencia neuronal, diferenciación, apoptosis, expresión de neurotransmisores y excitotoxicidad en el cerebro en desarrollo (revisado por Boksa, 2010), por lo que es de esperar que su mayor expresión debido a la infección prenatal contribuyan a alteraciones en el neurodesarrollo.

En nuestros experimentos, descubrimos que las ratas macho tratadas prenatalmente con LPS tienen mayores niveles plasmáticos de TNF α que los machos tratados prenatalmente con salino. Los niveles plasmáticos de TNF α en los machos tratados prenatalmente con LPS disminuyeron hasta igualarse con el de los controles cuando fueron

Discusión

tratados con estradiol. Este resultado está en consonancia con trabajos en un modelo prácticamente idéntico de infección prenatal, en que se observa que las ratas macho tratadas prenatalmente con LPS presentan un aumento de TNF α basal en suero (Romero y cols., 2007; Romero y cols., 2010). En nuestro caso además, demostramos que un tratamiento agudo con estradiol puede revertir este aumento. En este sentido es interesante señalar que en el estudio de Romero (Romero y cols., 2007) descubrieron que elevaciones en los niveles plasmáticos de TNF α están directamente relacionadas con defectos en la inhibición prepulso, mientras que la normalización de la inhibición prepulso mediante la administración de un antipsicótico va acompañada de una normalización en los niveles de TNF α . En nuestro caso, el tratamiento con estradiol se comporta en cierta medida como un antipsicótico, ya que la inhibición en el prepulso de 3 dB en los machos tratados prenatalmente con LPS es revertida por el estradiol, que también revierte la elevación en los niveles plasmáticos de TNF α .

Otra cuestión a resaltar, es que se ha propuesto un efecto protector del estradiol en la enfermedad de Parkinson y al TNF α como uno de los agentes que causan efectos perniciosos en neuronas dopaminérgicas nigroestriales en modelos de Parkinson (Czlonkowska y cols., 2005). Esto estaría en plena consonancia con la disminución de la respuesta dopaminérgica, asociada a altos niveles de TNF α , que hemos detectado en las ratas macho tratadas prenatalmente con LPS y con el hecho de que ambos parámetros se normalizan por el tratamiento con estradiol.

En consonancia con nuestros resultados, estudios previos *in vitro* han mostrado que el estradiol disminuye la expresión de TNF α en células de microglía (Bruce-Keller y cols., 2001; Vegeto y cols., 2001). Asimismo, en modelos de inflamación *in vivo* se ha demostrado que el estradiol reduce la activación glial, responsable de un aumento de citoquinas proinflamatorias en cerebro (Tapia-González y cols., 2008; Barreto y cols., 2009). Las alteraciones en citoquinas proinflamatorias descritas en nuestro estudio y en otros (Borrel y cols., 2002; Romero y cols., 2007; Romero y cols., 2010) son similares a las que se han detectado en pacientes esquizofrénicos, en los que se observa una mayor activación inmune basal que en personas sanas (Meyer y cols., 2011).

Discusión

El LPS prenatal no induce alteraciones en TNF α basal en hembras y tampoco se observa ningún efecto de la ovariectomía ni del estradiol

En contraste con los hallazgos en las ratas macho, en las hembras no encontramos ningún cambio en los niveles plasmáticos de TNF α . Esto está de acuerdo con los resultados de Borrell (Borrell y cols., 2002) que encontró menores alteraciones en otras citoquinas inflamatorias en hembras LPS que en machos LPS, sin embargo hasta donde sabemos esta es la primera vez que se mide TNF α en hembras tratadas prenatalmente con LPS. En más casos se han descrito diferencias entre machos y hembras en la expresión de citoquinas proinflamatorias (Pozzi y cols., 2006; Czlonkowska y cols., 2005), lo que podría explicar que los machos LPS presenten alteraciones en TNF α y las hembras no.

El estradiol induce un aumento en los niveles plasmáticos de IL-1ra en ratas macho tratadas con LPS prenatal, sin afectar estos niveles en las ratas macho tratadas con salino

La citoquina proinflamatoria IL-1 β es uno de los mediadores de la respuesta al LPS (Li y cols., 2001). Su efecto es atenuado por el antagonista del receptor IL-1 β (IL-1ra) mediante la unión y consiguiente bloqueo del receptor (Conti y cols., 2004). En pacientes esquizofrénicos se han descrito numerosas alteraciones en los niveles de citoquinas inflamatorias en suero (Fan y cols., 2007; Drexhage y cols., 2010), pero también existen alteraciones en niveles de citoquinas anti inflamatorias, entre ellas el IL-1ra (Maes y cols., 1996; Akiyama, 1999; Kim y cols., 2000). Además, la administración de IL-1ra a ratas preñadas y expuestas a LPS previene la activación microglial y los déficits motores observados en su descendencia como consecuencia de la exposición prenatal al LPS (Girard y cols., 2010). Por estos motivos consideramos interesante determinar los niveles de IL-1 β y de IL-1ra en nuestras ratas. La cuantificación de IL-1 β fue imposible de realizar ya que los niveles estaban por debajo del límite de detección del ELISA, pero sí que pudimos determinar los niveles de IL-1ra, los cuales no se habían estudiado anteriormente en modelos de infección prenatal.

Las ratas macho tratadas prenatalmente con LPS mostraron niveles idénticos de IL-1ra respecto a las ratas tratadas prenatalmente con salino, sin embargo el estradiol indujo en las ratas tratadas con LPS una elevación de IL-1ra que no indujo en las ratas tratadas

Discusión

con salino. En este sentido, los resultados están en la línea de los obtenidos para el $\text{TNF}\alpha$, en los que el estradiol sólo ejerce un efecto en los animales LPS y no en los animales control. También resulta similar el efecto del estradiol al de los antipsicóticos, en el sentido de que una de sus acciones es la elevación de niveles de citoquinas antiinflamatorias (Akiyama, 1999; Maes y cols., 1996, 1997; Müller y cols., 1997; Song y cols., 2000; Sugino y cols., 2009).

El LPS prenatal induce un aumento en los niveles plasmáticos de IL-1ra en ratas hembra

Por otra parte, las ratas hembra tratadas prenatalmente con LPS mostraron mayores niveles de IL-1ra que las hembras tratadas prenatalmente con salino. La ovariectomía indujo un aumento en IL-1ra tanto en las hembras tratadas con LPS como en las hembras tratadas con salino y el estradiol disminuyó los niveles de IL-1ra sólo en las hembras tratadas con LPS, sin afectar a las tratadas prenatalmente con salino. Estudios previos han demostrado que existen importantes diferencias sexuales en la expresión de IL-1ra, tanto en humanos como en ratas; las hembras expresan mayores niveles de IL-1ra, tanto basales como en respuesta al LPS. Además las ratas y las mujeres en estado de gestación tienen mayores niveles de IL-1ra que las ratas o las mujeres no gestantes (Ashdown y cols., 2007; Pillay y cols., 1993; Cannon y cols., 1998). El que las hembras tengan mayores de IL-1ra se ha correlacionado con una menor inducción de IL-1 β y COX-2 en el hipotálamo como consecuencia de la exposición al LPS (Ashdown y cols., 2007). Por lo tanto, la elevación en los niveles de IL-1ra en las hembras tratadas prenatalmente con LPS podría representar un mecanismo endógeno de protección, que no se activaría en los machos.

La ovariectomía produce un aumento en los niveles plasmáticos de IL-1ra independientemente del tratamiento prenatal y el estradiol los disminuye, pero sólo en las ratas tratadas prenatalmente con LPS

La IL-1ra aumenta su expresión paralelamente a un aumento en los niveles de IL-1 (Arend, 1991) y existen evidencias de que las hormonas gonadales femeninas modulan los niveles de IL-1 (Cannon y Dinarello, 1985; Polan y cols., 1988; Konecna y cols., 2000). Por este mecanismo las hormonas gonadales podrían regular los niveles de IL-1ra. La progesterona y el estradiol inhiben la producción de mRNA de IL-1 (Polan y cols., 1989)

Discusión

por lo que cabría esperar que una privación de estas por ovariectomía aumentara los niveles basales de IL-1, y por ende de su antagonista el IL-1ra. En este sentido habría sido interesante tener las medidas de IL-1, pero como comentábamos, los niveles basales de IL-1 estaban por debajo del límite de detección.

En nuestro estudio las ratas tratadas prenatalmente con LPS mostraron un aumento en los niveles plasmáticos de IL-1ra como consecuencia de la ovariectomía, a diferencia de las tratadas prenatalmente con salino, que no mostraron ningún efecto de la ovariectomía sobre estos niveles. Además de que este aumento en IL-1ra se produzca por un efecto directo de la privación de hormonas gonadales, otra posibilidad es que se deba al aumento de tejido adiposo producido por la ovariectomía ya que se ha descubierto que este tejido es una importante fuente de IL-1ra (Juge-Aubry y cols., 2003). En este sentido es interesante comentar que en nuestro estudio, las hembras gonadectomizadas mostraron un peso significativamente mayor que las sham, y este efecto fue más pronunciado en las hembras tratadas prenatalmente con LPS (datos no mostrados). Por otra parte, las hembras LPS parecen mostrar una mayor sensibilidad al estradiol que las hembras control. Este dato, junto al de COX-2 en que las hembras LPS mostraban una insensibilidad al tratamiento, hace pensar que en las hembras LPS quizá haya alteraciones en la regulación neuroinmunoendocrina, aunque de alguna manera puedan estar compensadas de forma que no muestren las alteraciones conductuales que muestran los machos.

El LPS prenatal en ratas macho induce una disminución de COX-2 en corteza prefrontal y una respuesta alterada en la regulación de COX-2 por estradiol en el núcleo accumbens

Uno de los eventos asociados a inflamación periférica es el aumento de expresión de la ciclooxygenasa-2 (COX-2) inducido por citoquinas proinflamatorias (DuBois y cols., 1998; Vane y cols., 1994). La COX-2 es una enzima clave en la síntesis de prostaglandinas a partir del ácido araquidónico (Henrion y cols., 1997; Feletou y Vanhoutte, 2006; Blanco-Rivero y cols., 2005). Las prostaglandinas median las respuestas de inflamación y fiebre (Bos y cols., 2004). Puesto que en varios modelos de infección prenatal, incluido el nuestro, se han encontrado mayores niveles de citoquinas proinflamatorias en suero,

Discusión

consideramos interesante determinar si esto se correlacionaba con una mayor expresión de COX-2 en la corteza prefrontal y el núcleo accumbens.

Observamos que las ratas macho tratadas prenatalmente con LPS mostraban una menor expresión de COX-2 en corteza prefrontal, que las tratadas prenatalmente con salino, independientemente del tratamiento con estradiol. En un principio podría parecer contradictorio, puesto que una de las principales características de los modelos de infección prenatal es una mayor expresión de marcadores de inflamación (Boksa y cols, 2010). Sin embargo, además de su papel en inflamación, la COX-2 también se expresa constitutivamente en tejido nervioso (O'Banion, 1999; Yamagata y cols., 1993) y sus productos, especialmente la prostaglandina 2 (PGE₂), están implicadas en varias funciones esenciales como la diferenciación sexual del cerebro durante el desarrollo fetal (Amateau y McCarthy, 2004) y la regulación de la neurotransmisión glutamatérgica en la vida adulta (Dave y cols., 2011).

En los últimos años se ha propuesto que la esquizofrenia también tiene sus raíces en una alteración en la transmisión glutamatérgica. Se postuló que una de las características de la esquizofrenia consistía en estados hipoglutamatérgicos y una menor función de los receptores NMDA (Olney y Farber, 1995). El sustento de esta teoría viene de que sustancias antagonistas de los receptores de glutamato inducen síntomas psicóticos en individuos sanos (Krystal y cols., 1994) y empeoran los síntomas en pacientes esquizofrénicos (Lahti y cols., 1995). Este efecto se ha observado también en modelos animales de esquizofrenia basados en el uso de antagonistas NMDA como fenciclidina o MK-801 (Hashimoto y cols, 2005; Vigano y cols, 2009; de Lima y cols., 2005) y varios autores han descrito alteraciones en la neurotransmisión glutamatérgica en modelos de infección prenatal (Lante y cols., 2007; Meyer y cols., 2008; Roumier y cols., 2008).

Por tanto, la menor expresión de COX-2 en las ratas macho tratadas prenatalmente con LPS, puede representar un defecto relevante, ya que una disminución de los niveles de COX-2 podría implicar una disminución de PGE₂ y por lo tanto podría ser causante de una disminución en la neurotransmisión por glutamato (Dave y cols., 2011). En consonancia con esto, el grupo de Maida descubrió que en corteza de hombres esquizofrénicos había

Discusión

una disminución de la PGE2 sintasa (Maida y cols., 2006). Otro dato interesante es que se ha asociado el uso de inhibidores de la COX-2 con un aumento de síntomas psiquiátricos (Onder y cols., 2004; Jiang y Chang 1999), aunque a este respecto también hay estudios que sugieren lo contrario (Müller y cols, 2010) lo que induce a pensar que quizás en términos generales, en enfermedades psiquiátricas se podría dar una expresión alterada de COX-2 que podría ser tanto a la alza como a la baja, dependiendo del área del cerebro.

El LPS prenatal en ratas hembras produce una falta de respuesta a la regulación de COX-2 inducida por estradiol en corteza prefrontal y núcleo accumbens

En el caso de las ratas hembra tratadas prenatalmente con LPS, a diferencia de los machos, no se observó ningún cambio en los niveles de COX-2, respecto a las hembras tratadas prenatalmente con salino, en ninguno de los tejidos estudiados. Como exponíamos, la COX-2 juega un papel esencial en la diferenciación sexual del cerebro: a partir de su inducción por el estradiol aumenta la concentración de prostaglandinas (Schwarz y cols., 2008; Wright y cols, 2010), siendo la PGE2 uno de los agentes responsables de la masculinización del cerebro (Amateau y cols, 2004). Por lo tanto sería posible que diferencias en la actividad de COX-2 entre machos y hembras durante el desarrollo fetal como consecuencia de la exposición al LPS, pudieran generar diferencias sexuales en la respuesta del cerebro a situaciones patológicas en la vida adulta.

La privación de hormonas gonadales por ovariectomía indujo un aumento considerable en la expresión de COX-2 en el núcleo accumbens de las hembras tratadas prenatalmente con salino pero no en las hembras tratadas prenatalmente con LPS. Por último, el tratamiento agudo con estradiol disminuyó ligeramente la expresión de COX-2 en la corteza prefrontal, y también disminuyó en gran medida la expresión de COX-2 en el núcleo accumbens de las hembras tratadas prenatalmente con salino, aunque sin revertir totalmente el efecto de la ovariectomía. El estradiol no produjo ningún efecto sobre los niveles de COX-2 en las hembras tratadas prenatalmente con LPS.

En estudios con roedores hembra se ha demostrado que la administración de estradiol a ratas ovariectomizadas inhibe la inducción de COX-2 mediada por la citoquina proinflamatoria IL-1 β (Ospina y cols, 2004). Además, un pretratamiento con estradiol

Discusión

inhibe la producción de COX-2 y citoquinas inflamatorias en astrocitos expuestos a la proteína β -amiloide. Se ha propuesto que uno de los mecanismos asociados al efecto antiinflamatorio del estradiol consiste en la inhibición del NF- κ B (Galea y cols, 2002). Otro mecanismo por el que el estradiol es antiinflamatorio es por su capacidad antioxidante que puede limitar el daño producido por la generación de especies reactivas de oxígeno durante la activación inmune (Behl y cols., 1997; Szelényi, 2001). Estos y muchos otros estudios demuestran la capacidad antiinflamatoria del estradiol en modelos animales sometidos a un estímulo proinflamatorio (revisado por Pozzi y cols., 2006), lo que podría explicar que la falta de esta hormona por ovariectomía induzca un estado de inflamación detectable por el aumento de COX-2. En trabajos con animales ovariectomizados, sin que estos hayan sido sometidos a ningún estímulo inflamatorio, se ha detectado que efectivamente la ovariectomía induce un estado de inflamación en diversos tejidos, por lo que es posible que en cerebro ocurra otro tanto (Kireev y cols., 2010; Abu-Taha y cols, 2009; Baeza y cols., 2011; Surmeli y cols., 2011; Routley y cols., 2009). Asimismo, nuestros resultados en los experimentos de estrés crónico (ver capítulo de Resultados, apartado 1.3) muestran que la ovariectomía per se, induce un aumento de marcaje de astrocitos y células NG2, lo cual también podría sugerir que simplemente la privación de hormonas gonadales basta para predisponer al organismo a un estado inflamatorio. Se ha demostrado que uno de los principales mecanismos del estradiol para ejercer su acción antiinflamatoria es a través de su receptor α (Vegeto y cols, 2003), por lo que quizás, al no responder las hembras tratadas prenatalmente con LPS a la privación hormonal, ni al tratamiento con estradiol exógeno, se podría suponer que tienen algún defecto en la señalización por este receptor, aunque serían necesarios más estudios para comprobarlo.



Discusión

.

CONCLUSIONES

Conclusiones

Conclusiones

1. La privación de hormonas ováricas a largo plazo induce conductas de tipo ansioso y al sumarla al estrés crónico hace emerger comportamientos de tipo depresivo.
2. La privación de hormonas ováricas a corto y largo plazo induce un aumento en la densidad de células de glía inmunoreactivas para GFAP o NG2 y una disminución en la proliferación celular en el giro dentado, mientras que el estrés por sí solo no parece ejercer ningún efecto sobre estos parámetros.
3. El estradiol, la progesterona y los moduladores selectivos de los receptores de estrógeno tamoxifeno y raloxifeno son capaces de revertir el comportamiento de tipo depresivo y ansioso producido por la privación de hormonas ováricas de larga duración y el estrés crónico.
4. La inflamación prenatal inducida por inyección con LPS induce alteraciones en las rutas de señalización reguladas por IGF-1 y el estradiol en las ratas macho.
5. La inflamación prenatal inducida por inyección con LPS produce en ratas macho adultas, pero no en hembras, un deterioro en el reconocimiento de objetos. La privación de hormonas gonadales también induce un defecto en reconocimiento de objetos en ratas macho, sin afectar a las hembras, lo que nos revela que existe un dimorfismo sexual en la susceptibilidad de los procesos cognitivos a la inflamación prenatal.
6. El tratamiento con estradiol, progesterona, tamoxifeno y raloxifeno previene el deterioro en reconocimiento de objetos observado en las ratas macho tratadas prenatalmente con LPS.
7. La inyección prenatal con LPS induce deterioros en conductas relevantes para la esquizofrenia y la enfermedad de Parkinson en ratas machos, pero no en ratas hembra. El estradiol es capaz de revertir dichas alteraciones. Estos defectos podrían estar directamente relacionados con alteraciones en la actividad dopaminérgica y en marcadores de inflamación como TNF- α , cuyos niveles también son regulados por el estradiol.

Conclusiones

8. La privación de hormonas ováricas prepuberalmente en ratas hembra no afecta a la inhibición prepulso, pero sí induce una fuerte disminución en su respuesta dopaminérgica.

9. El tratamiento con LPS prenatal afecta de una manera distinta y más pronunciada a las ratas macho en marcadores de inflamación y de actividad dopaminérgica.

10. La ovariectomía prepuberal induce alteraciones en marcadores de actividad dopaminérgica y marcadores de inflamación en las ratas hembras. Además, estos parámetros se ven afectados de una manera diferente por el tratamiento con estradiol en las ratas hembra tratadas prenatalmente con LPS y en las ratas hembras control.

BIBLIOGRAFÍA

Bibliografia

Bibliografía

Abekawa, T., Ito, K., Nakato, Y., Koyama, T. (2011). "Developmental GABAergic deficit enhances methamphetamine-induced apoptosis." *Psychopharmacology* 215(3): 413-427.

Aberg, D. (2010). "Role of the growth hormone/insulin-like growth factor 1 axis in neurogenesis." *Endocrine Development* 17: 63-76.

Abi-Dargham, A., Gil, R., Krystal, J., Baldwin, RM., Seibyl, JP., Bowers, M., van Dyck, CH., Charney, DS., Innis, RB., Laruelle, M. (1998). "Increased striatal dopamine transmission in schizophrenia: confirmation in a second cohort." *The American Journal of Psychiatry* 155(6): 761-767.

Abu-Taha, M., Rius, C., Hermenegildo, C., Noguera, I., Cerda-Nicolas, JM., Issekutz, AC., Jose, PJ., Cortijo, J., Morcillo, EJ., Sanz, MJ. (2009). "Menopause and ovariectomy cause a low grade of systemic inflammation that may be prevented by chronic treatment with low doses of estrogen or losartan." *The Journal of Immunology* 183(2): 1393-1402.

Adler, A., Vescovo, P., Robinson, JK., Kritzer, MF. (1999). "Gonadectomy in adult life increases tyrosine hydroxylase immunoreactivity in the prefrontal cortex and decreases open field activity in male rats." *Neuroscience* 89(3): 939-954.

Aguilar-Valles, A., Luheshi, GN. (2011). "Alterations in cognitive function and behavioral response to amphetamine induced by prenatal inflammation are dependent on the stage of pregnancy." *Psychoneuroendocrinology* 36(5): 634-648.

Aguirre, A., Gallo, V. (2004). "Postnatal neurogenesis and gliogenesis in the olfactory bulb from NG2-expressing progenitors of the subventricular zone." *The Journal of Neuroscience* 24(46): 10530-41.

Akiyama, K. (1999). "Serum levels of soluble IL-2 receptor α , IL-6 and IL-1 receptor antagonist in schizophrenia before and during neuroleptic administration." *Schizophrenia Research* 37(1): 97-106.

Bibliografia

- Aleman, A., de Vries, WR., de Haan, EH., Verhaar, HJ., Samson, MM., Koppeschaar, HP. (2000). "Age-sensitive cognitive function, growth hormone and insulin-like growth factor 1 plasma levels in healthy older men." *Neuropsychobiology* 41(2): 73-78.
- Alonso, G. (2005). "NG2 proteoglycan-expressing cells of the adult rat brain: Possible involvement in the formation of glial scar astrocytes following stab wound". *Glia* 49: 318-338.
- Amantea, D., Russo, R., Bagetta, G., Corasaniti, MT. (2005). "From clinical evidence to molecular mechanisms underlying neuroprotection afforded by estrogens." *Pharmacological Research* 52(2): 119-132.
- Amateau, S., McCarthy, MM. (2004). "Induction of PGE2 by estradiol mediates developmental masculinization of sex behavior." *Nature Neuroscience* 7(6): 643-650.
- Ames, B., Shigenaga, MK., Hagen, TM. (1993). "Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90(17): 7915-7922.
- Anastasio, N., Xia, Y., O'Connor, ZR., Johnson, KM. (2009). "Differential role of N-methyl-d-aspartate receptor subunits 2A and 2B in mediating phencyclidine-induced perinatal neuronal apoptosis and behavioral deficits." *Neuroscience* 163(4): 1181-1191.
- Anderson, M., Aberg, MA., Nilsson, M., Eriksson, PS. (2002). "Insulin-like growth factor-I and neurogenesis in the adult mammalian brain." *Developmental Brain Research* 134(1-2): 115-122.
- Andreasen, N., Pierson, R. (2008). "The role of the cerebellum in schizophrenia." *Biological Psychiatry* 64(2): 81-88.

Bibliografia

Anisman, H., Ravindran, AV., Griffiths, J., Merali, Z. (1999). "Endocrine and cytokine correlates of major depression and dysthymia with typical or atypical features." *Molecular Psychiatry* 4(2): 182-188.

Arad, M., Weiner, I. (2010). "Contrasting effects of increased and decreased dopamine transmission on latent inhibition in ovariectomized rats and their modulation by 17beta-estradiol: an animal model of menopausal psychosis?" *Neuropsychopharmacology* 35(7): 1570-1582.

Arend, W. (1991). "Interleukin 1 receptor antagonist. A new member of the interleukin 1 family." *The Journal of Clinical Investigation* 88(5): 1445-1451.

Arevalo, M., Santos-Galindo, M., Lagunas, N., Azcoitia, I., Garcia-Segura, LM., (2011). "Selective estrogen receptor modulators as brain therapeutic agents." *Journal of Molecular Endocrinology* 46(1): R1-9.

Arvanitis, D., Wang, H., Bagshaw, RD., Callahan, JW., Boggs, JM. (2004). "Membrane-associated estrogen receptor and caveolin-1 are present in central nervous system myelin and oligodendrocyte plasma membranes." *Journal of Neuroscience Research* 75(5): 603-613.

Ashdown, H., Poole, S., Boksa, P., Luheshi, GN. (2007). "Interleukin-1 receptor antagonist as a modulator of gender differences in the febrile response to lipopolysaccharide in rats." *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 292(4): R1667-R1674.

Atchley, D., Weaver, KL., Eckel, LA. (2005). "Taste responses to dilute sucrose solutions are modulated by stage of the estrous cycle and fenfluramine treatment in female rats." *Physiology & Behavior* 86(3): 265-271.

Auger, C., Forbes-Lorman, RM. (2008). "Progestin Receptor-Mediated Reduction of Anxiety-Like Behavior in Male Rats." *PLoS ONE* 3(11): e3606.

Bibliografia

- Autry, A., Adachi, M., Cheng, P., Monteggia, LM. (2009). "Gender-specific impact of brain-derived neurotrophic factor signaling on stress-induced depression-like behavior." *Biological Psychiatry* 66(1): 84-90.
- Azcoitia, I., Sierra, A., Garcia-Segura, LM. (1998). "Estradiol prevents kainic acid-induced neuronal loss in the rat dentate gyrus." *NeuroReport* 9(13): 3075-3079.
- Azevedo, R., Lacava, ZG., Miyasaka, CK., Chaves, SB., Curi, R. (2001). "Regulation of antioxidant enzyme activities in male and female rat macrophages by sex steroids." *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 34: 683-687.
- Baeza, I., De Castro, NM., Arranz, L., Fdez-Tresguerres, J., De la Fuente, M. (2011). "Ovariectomy causes immunosenescence and oxi-inflamm-ageing in peritoneal leukocytes of aged female mice similar to that in aged males." *Biogerontology* 12(3): 227-238.
- Bagetta, G., Chiappetta, O., Amantea, D., Iannone, M., Rotiroti, D., Costa, A., Nappi, G., Corasaniti, MT. (2004). "Estradiol reduces cytochrome c translocation and minimizes hippocampal damage caused by transient global ischemia in rat." *Neuroscience Letters* 368(1): 87-91.
- Baker, S., Kentner, AC., Konkle, AT., Santa-Maria Barbagallo, L., Bielajew, C. (2006). "Behavioral and physiological effects of chronic mild stress in female rats." *Physiology & Behavior* 87(2): 314-322.
- Balijs, T., Lowry, SF. (2011). "Lipopolysaccharide and sepsis-associated myocardial dysfunction." *Current Opinion in Infectious Diseases* 24(3): 248-253.
- Barlow, B., Cory-Slechta, DA., Richfield, EK., Thiruchelvam, M. (2007). "The gestational environment and Parkinson's disease: Evidence for neurodevelopmental origins of a neurodegenerative disorder." *Reproductive Toxicology* 23(3): 457-470.

Bibliografía

Barnes, M., Huxley-Jones, J., Maycox, PR., Lennon, M., Thornber, A., Kelly, F., Bates, S., Taylor, A., Reid, J., Jones, N., Schroeder, J., Scorer, CA., Davies, C., Hagan, JJ., Kew, JN., Angelinetta, C., Akbar, T., Hirsch, S., Mortimer, AM., Barnes, TR., de Bellerocche, J. (2011). "Transcription and pathway analysis of the superior temporal cortex and anterior prefrontal cortex in schizophrenia." *Journal of Neuroscience Research* 89(8): 1218-1227.

Barreto, G. (2009). "Regulación por andrógenos y estrógenos de la gliosis tras lesiones cerebrales en rata." Facultad de Ciencias Biológicas, Departamento de Biología Celular Madrid, Universidad Complutense de Madrid. Tesis para la obtención del grado de Doctor en Neurociencia.

Barreto, G., Santos-Galindo, M., Diz-Chaves, Y., Pernia, O., Carrero, P., Azcoitia, I., Garcia-Segura, LM., (2009). "Selective estrogen receptor modulators decrease reactive astrogliosis in the injured brain: effects of aging and prolonged depletion of ovarian hormones." *Endocrinology* 150(11): 5010-5015.

Beal, M. (1992). "Mechanisms of excitotoxicity in neurologic diseases." *The FASEB Journal* 6(15): 3338-3344.

Beasley, C., Cotter, D., Khan, N., Pollard, C., Sheppard, P., Varndell, I., Lovestone, S., Anderton, B., Everall, I. (2001). "Glycogen synthase kinase-3[beta] immunoreactivity is reduced in the prefrontal cortex in schizophrenia." *Neuroscience Letters* 302(2-3): 117-120.

Beato, M., Arnemann, J., Chalepakis, G., Slater, E., Willmann, T. (1987). "Gene regulation by steroid hormones." *Journal of Steroid Biochemistry* 27(1-3): 9-14.

Beatty, W. W. (1979). "Gonadal hormones and sex differences in nonreproductive behaviors in rodents: Organizational and activational influences." *Hormones and Behavior* 12(2): 112-163.

Bibliografia

- Beaulieu, J. (2011). "A role for Akt and glycogen synthase kinase-3 as integrators of dopamine and serotonin neurotransmission in mental health." *Journal of Psychiatry & Neuroscience: JPN* 136(4).
- Bebbington, P., Hurry, J., Tennant, C., Sturt, E., Wing, JK. (1981). "Epidemiology of mental disorders in Camberwell." *Psychological Medicine* 11(3): 561-579.
- Bebo, B., Dehghani, B., Foster, S., Kurniawan, A., Lopez, FJ., Sherman, LS. (2009). "Treatment with selective estrogen receptor modulators regulates myelin specific T-cells and suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis." *Glia* 57(7): 777-790.
- Becker, J. (1990). "Direct effect of 17 beta-estradiol on striatum: sex differences in dopamine release." *Synapse* 5(2): 157-164.
- Becker, J. B. (1999). "Gender differences in dopaminergic function in striatum and nucleus accumbens." *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 64(4): 803-812.
- Beckley, E., Finn, DA. (2007). "Inhibition of progesterone metabolism mimics the effect of progesterone withdrawal on forced swim test immobility." *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 87(4): 412-419.
- Behl, C., Skutella, T., Lezoualc'h, F., Post, A., Widmann, M., Newton, CJ., Holsboer, F. (1997). "Neuroprotection against oxidative stress by estrogens: structure-activity relationship." *Molecular Pharmacology* 51(4): 535-541.
- Behl, C., Skutella, T., Lezoualc'h, F., Post, A., Widmann, M., Newton, CJ., Holsboer, F. (1997). "Neuroprotection against Oxidative Stress by Estrogens: Structure-Activity Relationship." *Molecular Pharmacology* 51(4): 535-541.

Bibliografia

Behl, C., Widmann, M., Trapp, T., Holsboer, F. (1995). "17-[beta] estradiol protects neurons from oxidative stress-induced cell death in vitro." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 216(2): 473-482.

Belachew, S., Chittajallu, R., Aguirre, AA., Yuan ,X., Kirby, M., Anderson, S., Gallo, V. (2003). "Postnatal NG2 proteoglycan-expressing progenitor cells are intrinsically multipotent and generate functional neurons." *Journal of Cell Biology* 161(1): 169-186.

Benedetti, M., Maraganore, DM., Bower, JH., McDonnell, SK., Peterson, BJ., Ahlskog, JE., Schaid, DJ., Rocca, WA. (2001). "Hysterectomy, menopause, and estrogen use preceding Parkinson's disease: An exploratory case-control study." *Movement Disorders* 16(5): 830-837.

Bernardi, F., Pluchino, N., Stomati, M., Pieri, M., Genazzani, AR. (2003). "CNS: sex steroids and SERMs." *Annals of the New York Academy of Sciences* 997(1): 378-388.

Bernardi, M., Vergoni, AV., Sandrini, M., Tagliavini, S., Bertolini, A. (1989). "Influence of ovariectomy, estradiol and progesterone on the behavior of mice in an experimental model of depression." *Physiology & Behavior* 45(5): 1067-1068.

Bethea, C., Lu, NZ., Gundlah, C., Streicher, JM. (2002). "Diverse actions of ovarian steroids in the serotonin neural system." *Frontiers in Neuroendocrinology* 23(1): 41-100.

Bitran, D., Purdy, RH., Kellogg, CK. (1993). "Anxiolytic effect of progesterone is associated with increases in cortical allopregnanolone and GABAA receptor function." *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 45(2): 423-428.

Bittner, A., Goodwin, RD., Wittchen, HU., Beesdo, K., Höfler, M., Lieb, R. (2004). "What characteristics of primary anxiety disorders predict subsequent major depressive disorder?" *The Journal of Clinical Psychiatry* 65(5): 618-626.

Bibliografia

- Björnström, L., Sjöberg, M. (2005). "Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes." *Molecular Endocrinology* 19(4): 833-842.
- Blanco-Rivero, J., Cachofeiro, V., Lahera, V., Aras-Lopez, R., Márquez-Rodas, I., Salaices, M., Xavier, FE., Ferrer, M., Balfagón, G. (2005). "Participation of prostacyclin in endothelial dysfunction induced by aldosterone in normotensive and hypertensive rats." *Hypertension* 46(1): 107-112.
- Blaustein, J., Wade, GN. (1976). "Ovarian influences on the meal patterns of female rats." *Physiology & Behavior* 17(2): 201-208.
- Blurton-Jones, M., Kuan, PN., Tuszynski, MH. (2004). "Anatomical evidence for transsynaptic influences of estrogen on brain-derived neurotrophic factor expression." *The Journal of Comparative Neurology* 468(3): 347-360.
- Boksa, P. (2010). "Effects of prenatal infection on brain development and behavior: A review of findings from animal models." *Brain, Behavior, and Immunity* 24(6): 881-897.
- Bondy, C., Cheng, CM. (2004). "Signaling by insulin-like growth factor 1 in brain." *European Journal of Pharmacology* 490(1-3): 25-31.
- Borrás, C., Sastre, J., García-Sala, D., Lloret, A., Pallardó, FV., Viña, J. (2003). "Mitochondria from females exhibit higher antioxidant gene expression and lower oxidative damage than males." *Free Radical Biology and Medicine* 34(5): 546-552.
- Borrell, J., Vela, JM., Arévalo-Martin, A., Molina-Holgado, E., Guaza, C. (2002). "Prenatal immune challenge disrupts sensorimotor gating in adult rats. Implications for the etiopathogenesis of schizophrenia." *Neuropsychopharmacology* 26(2).

Bibliografia

Bos, C., Richel, DJ., Ritsema, T.,Peppelenbosch, MP.,Versteeg, HH. (2004). "Prostanoids and prostanoid receptors in signal transduction." *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 36(7): 1187-1205.

Bossé, R., Di Paolo, T. (1995). "Dopamine and GABAA receptor imbalance after ovariectomy in rats: model of menopause." *Journal of Psychiatry & Neuroscience* 20(364-71).

Bossé, R., Di Paolo, T. (1996). "The modulation of brain dopamine and GABAA receptors by estradiol: a clue for CNS changes occurring at menopause." *Celular and Molecular Neurobiology* 16(2): 199-212.

Bossé, R., Rivest, R., Di Paolo, T. (1997). "Ovariectomy and estradiol treatment affect the dopamine transporter and its gene expression in the rat brain." *Brain Research. Molecular Brain Research* 46(1-2): 343-346.

Bourque, M., Dluzen, DE., Di Paolo, T. (2009). "Neuroprotective actions of sex steroids in Parkinson's disease." *Frontiers in Neuroendocrinology* 30(2): 142-157.

Bourque, M., Liu, B., Dluzen, DE., Di Paolo, T. (2007). "Tamoxifen protects male mice nigrostriatal dopamine against methamphetamine-induced toxicity." *Biochemical Pharmacology* 74(9): 1413-1423.

Braff, D., Stone, C., Callaway, E., Geyer, M., Glick, I., Bali, L. (1978). "Prestimulus effects on human startle reflex in normals and schizophrenics." *Psychophysiology* 15(4): 339-343.

Breier, A., Su, TP.,Saunders, R.,Carson, RE.,Kolachana, BS.,de Bartolomeis, A.,Weinberger, DR.,Weisenfeld, N.,Malhotra, AK.,Eckelman, WC.,Pickar, D. (1997). "Schizophrenia is associated with elevated amphetamine-induced synaptic dopamine concentrations: Evidence from a novel positron emission tomography method." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94(6): 2569-2574.

Bibliografia

- Breslau, N., Schultz, L., Peterson, E. (1995). "Sex differences in depression: a role for preexisting anxiety." *Psychiatry Research* 58(1): 1-12.
- Breuer, B., Anderson, R. (2000). "The relationship of tamoxifen with dementia, depression, and dependence in activities of daily living in elderly nursing home residents." *Women & Health* 31(1): 71 - 85.
- Bromberger, J., Kravitz, HM., Chang, YF., Cyranowski, JM., Brown, C., Matthews, KA. (2011). "Major depression during and after the menopausal transition: Study of Women's Health Across the Nation (SWAN)." *Psychological Medicine* 41(9): 1879-1888
- Brorson, J., Bindokas, VP., Iwama, T., Marcuccilli, CJ., Chisholm, JC., Miller, RJ. (1995). "The Ca²⁺ influx induced by beta-amyloid peptide 25-35 in cultured hippocampal neurons results from network excitation." *Journal of Neurobiology* 26(3): 325-338.
- Bruce-Keller, A., Barger, SW., Moss, NI., Pham, JT., Keller, JN., Nath, A. (2001). "Pro-inflammatory and pro-oxidant properties of the HIV protein Tat in a microglial cell line: attenuation by 17 β -estradiol." *Journal of Neurochemistry* 78(6): 1315-1324.
- Bruce-Keller, A., Keeling, JL., Keller, JN., Huang, FF., Camondola, S., Mattson, MP. (2000). "Antiinflammatory effects of estrogen on microglial activation." *Endocrinology* 141(10): 3646-3656.
- Brummelte, S., Pawluski, JL., Galea, Liisa AM. (2006). "High post-partum levels of corticosterone given to dams influence postnatal hippocampal cell proliferation and behavior of offspring: A model of post-partum stress and possible depression." *Hormones and Behavior* 50(3): 370-382.
- Butera, P., Beikirch, RJ. (1989). "Central implants of diluted estradiol: independent effects on ingestive and reproductive behaviors of ovariectomized rats." *Brain Research* 491(2): 266-273.

Bibliografía

Butterfield, D., Lauderback, CM. (2002). "Lipid peroxidation and protein oxidation in Alzheimer's disease brain: potential causes and consequences involving amyloid beta-peptide-associated free radical oxidative stress." *Free Radical Biology and Medicine* 32(11): 1050-1060.

Cai, Z., Pan, ZL., Pang, Y., Evans, OB., Rhodes, PG. (2000). "Cytokine induction in fetal rat brains and brain injury in neonatal rats after maternal lipopolysaccharide administration." *Pediatric Research* 47(1): 64-72.

Callier, S., Morissette, M., Grandbois, M., Di Paolo, T. (2000). "Stereospecific prevention by 17 β -estradiol of MPTP-induced dopamine depletion in mice." *Synapse* 37(4): 245-251.

Callier, S., Morissette, M., Grandbois, M., Pélaprat, D., Di Paolo, T., (2001). "Neuroprotective properties of 17 β -estradiol, progesterone, and raloxifene in MPTP C57Bl/6 mice." *Synapse* 41(2): 131-138.

Camacho-Arroyo, I., González-Arenas, A., Espinosa-Raya, J., Piña-Medina, AG., Picazo, O. (2011). "Short- and long-term treatment with estradiol or progesterone modifies the expression of GFAP, MAP2 and Tau in prefrontal cortex and hippocampus." *Life Sciences* 89(3-4): 123-128.

Cannon, J., Abad, LW., Vannier, E., Lynch, EA. (1998). "Menstrual- and gender-dependent variations in circulating IL-1 agonists, antagonists, and binding proteins." *Journal of Leukocyte Biology* 63(1): 117-123.

Cannon, J., Dinarello, CA (1985). "Increased plasma interleukin-1 activity in women after ovulation." *Science* 227(4691): 1247-1249.

Cardona-Gómez, G., Mendez, P., DonCarlos, LL., Azcoitia, I., Garcia-Segura, LM. (2001). "Interactions of estrogens and insulin-like growth factor-I in the brain: implications for neuroprotection." *Brain Research Reviews* 37(1-3): 320-334.

Bibliografia

Carey, M., Deterd, CH., de Koning, J., Helmerhorst, F., de Kloet, ER. (1995). "The influence of ovarian steroids on hypothalamic-pituitary-adrenal regulation in the female rat." *Journal of Endocrinology* 144(2): 311-321.

Carlezon, W. J., Duman, RS., Nestler, EJ. (2005). "The many faces of CREB." *Trends in Neurosciences* 28(8): 436-445.

Carlsson, A., Hansson, LO., Waters, N., Carlsson, ML. (1997). "Neurotransmitter aberrations in schizophrenia: New perspectives and therapeutic implications." *Life Sciences* 61(2): 75-94.

Carranza-Lira, S., Gooch, AL., Saldivar, N., Osterwalder, MS. (2007). "Climacteric symptom control after the addition of low-dose esterified conjugated estrogens to raloxifene standard doses." *International Journal of Fertility and Women's Medicine* 52 (2-3): 93-96.

Carvey, P., Chang, Q., Lipton, JW., Ling, Z. (2003). "Prenatal exposure to the bacteriotoxin lipopolysaccharide leads to long-term losses of dopamine neurons in offspring: a potential, new model of Parkinson's disease." *Frontiers in Bioscience: a Journal and Virtual Library* 8: s826-837.

Cassilhas, R., Antunes, HK., Tufik, S., de Mello, MT. (2010). "Mood, anxiety, and serum IGF-1 in elderly men given 24 weeks of high resistance exercise." *Perceptual and Motor Skills* 110(1): 265-276.

Castagné, V., Cuénod, M., Do, KQ. (2004). "An animal model with relevance to schizophrenia: sex-dependent cognitive deficits in osteogenic disorder-Shionogi rats induced by glutathione synthesis and dopamine uptake inhibition during development." *Neuroscience* 123(4): 821-834.

Bibliografia

Castagné, V., Moser, PC., Porsolt, RD. (2009). Preclinical Behavioral Models for Predicting Antipsychotic Activity. *Advances in Pharmacology*. M. Enna SJ., W., Academic Press. Volume 57: 381-418.

Castall, B., Marsden, CD., Naylor, RJ., Pycock, CJ. (1977). "Stereotyped behaviour patterns and hyperactivity induced by amphetamine and apomorphine after discrete 6-hydroxydopamine lesions of extrapyramidal and mesolimbic nuclei." *Brain Research* 123(1): 89-111.

Castner, S., Xiao, L., Becker, JB. (1993). "Sex differences in striatal dopamine: in vivo microdialysis and behavioral studies." *Brain Research* 610(1): 127-134.

Cazzullo, C., Scarone, S., Grassi, B., Vismara, C., Trabattoni, D., Clerici, M., Clerici, M. (1998). "Cytokines production in chronic schizophrenia patients with or without paranoid behaviour." *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 22(6): 947-957.

Ceccarelli, I., Scaramuzzino, A., Aloisi, AM. (2001). "Effects of gonadal hormones and persistent pain on non-spatial working memory in male and female rats." *Behavioural Brain Research* 123(1): 65-76.

Cerghet, M., Skoff, RP., Bessert, D., Zhang, Z., Mullins, C., Ghandour, MS. (2006). "Proliferation and death of oligodendrocytes and myelin proteins are differentially regulated in male and female rodents." *The Journal of Neuroscience* 26(5): 1439-1447.

Chang, S., Renshaw, DC. (1986). "Psychosis and pregnancy." *Comprehensive Therapy* 12(10): 36-41.

Chen, X., Sun, C., Chen, Q., O'Neill, FA., Walsh, D., Fanous, AH., Chowdari, KV., Nimgaonkar, VL., Scott, A., Schwab, SG., Wildenauer, DB., Che, R., Tang, W., Shi, Y., He, L., Luo, XJ., Su, B., Edwards, TL., Zhao, Z., Kendler, KS. (2009). "Apoptotic engulfment pathway and schizophrenia." *PLoS ONE* 4(9): e6875.

Bibliografia

Cheskis, B., Greger, JG., Nagpal, S., Freedman, LP. (2007). "Signaling by estrogens." *Journal of Cellular Physiology* 213(3): 610-617.

Chlebowski, R., Hendrix, SL., Langer, RD., Stefanick, ML., Gass, M., Lane, D., Rodabough, RJ., Gilligan, MA., Cyr, MG., Thomson, CA., Khandekar, J., Petrovitch, H., McTiernan, A.; WHI Investigators. (2003). "Influence of estrogen plus progestin on breast cancer and mammography in healthy postmenopausal women." *JAMA: The Journal of the American Medical Association* 289(24): 3243-3253.

Chong, Z., Li, F., Maiese, K. (2005). "Activating Akt and the brain's resources to drive cellular survival and prevent inflammatory injury." *Histology and Histopathology* 20(1): 299-315.

Chourbaji, S., Urani, A., Inta, I., Sanchis-Segura, C., Brandwein, C., Zink, M., Schwaninger, M., Gass, P. (2006). "IL-6 knockout mice exhibit resistance to stress-induced development of depression-like behaviors." *Neurobiology of Disease* 23(3): 587-594.

Chubb, J., Bradshaw, NJ., Soares, DC., Porteous, DJ., Millar, JK. (2007). "The DISC locus in psychiatric illness." *Molecular Psychiatry* 13(1): 36-64.

Ciriza, I., Carrero, P., Azcoitia, I., Lundeen, S.G., Garcia-Segura, L.M., (2004). "Selective estrogen receptor modulators protect hippocampal neurons from kainic acid excitotoxicity: Differences with the effect of estradiol." *Journal of Neurobiology* 61(2): 209-221.

Ciriza, I., Carrero, P., Frye, CA., Garcia-Segura, LM. (2006). "Reduced metabolites mediate neuroprotective effects of progesterone in the adult rat hippocampus. The synthetic progestin medroxyprogesterone acetate (Provera) is not neuroprotective." *Journal of Neurobiology* 66(9): 916-928.

Claes, S. (2004). CRH, stress, and major depression: a psychobiological interplay. *Vitamins & Hormones*. Gerald, L. Academic Press. Volume 69: 117-150.

Bibliografia

Cole, M., Jones, C.T., Todd, I.D. (1971). "A new anti-oestrogenic agent in late breast cancer. An early clinical appraisal of ICI46474." *British Journal of Cancer* 25 (2): 270-275.

Conti, B., Tabarean, I., Andrei, C., Bartfai, T. (2004). "Cytokines and fever." *Frontiers in Neuroscience: a Journal and Virtual Library* 9: 1433-1449.

Corasaniti, M., Amantea, D., Russo, R., Piccirilli, S., Leta, A., Corazzari, M., Nappi, G., Bagetta, G. (2005). "17 beta-estradiol reduces neuronal apoptosis induced by HIV-1 gp120 in the neocortex of rat." *Neurotoxicology* 26(5): 893-903.

Cyr, M., Landry, M., Di Paolo, T. (2000). "Modulation by estrogen-receptor directed drugs of 5-hydroxytryptamine-2A receptors in rat brain." *Neuropsychopharmacology* 23(1): 69-78.

Cyr, M., Morissette, M., Landry, M., Di Paolo, T. (2001a). "Estrogenic activity of tamoxifen and raloxifene on rat brain AMPA receptors." *NeuroReport* 12(3): 535-539.

Cyr, M., Thibault, C., Morissette, M., Landry, M., Di Paolo, T. (2001b). "Estrogen-like activity of tamoxifen and raloxifene on NMDA receptor binding and expression of its subunits in rat brain." *Neuropsychopharmacology* 25(242-57).

Czlonkowska, A., Ciesielska, A., Gromadzka, G., Kurkowska-Jastrzebska, I. (2005). "Estrogen and cytokines production - the possible cause of gender differences in neurological diseases." *Current Pharmaceutical Design* 11(8): 1017-1030.

Darnaudéry, M., Perez-Martin, M., Bélizaire, G., Maccari, S., Garcia-Segura, L.M. (2006). "Insulin-like growth factor 1 reduces age-related disorders induced by prenatal stress in female rats." *Neurobiology of Aging* 27(1): 119-127.

Bibliografia

- Dave, K., Platel, JC., Huang, F., Tian, D., Stambouliau-Platel, S., Bordey, A. (2011). "Prostaglandin E2 induces glutamate release from subventricular zone astrocytes." *Neuron Glia Biology* 6(03): 201-207.
- Day, J., Laping, NJ., Lampert-Etchells, M., Brown, SA., O'Callaghan, JP., McNeill, TH., Finch, CE. (1993). "Gonadal steroids regulate the expression of glial fibrillary acidic protein in the adult male rat hippocampus." *Neuroscience* 55(2): 435-443.
- Day, R., Ganz, PA., Costantino, JP. (2001). "Tamoxifen and depression: more evidence from the national surgical adjuvant breast and bowel project's breast cancer prevention (P-1) randomized study." *Journal of the National Cancer Institute* 93(21): 1615-1623.
- De Lima, M., Laranja, DC., Bromberg, E., Roesler, R., Schröder, N. (2005). "Pre- or post-training administration of the NMDA receptor blocker MK-801 impairs object recognition memory in rats." *Behavioural Brain Research* 156(1): 139-143.
- De Nicola, A., Gonzalez, SL., Labombarda, F., Deniselle, MC., Garay, L., Guennoun, R., Schumacher, M. (2006). "Progesterone treatment of spinal cord injury: Effects on receptors, neurotrophins, and myelination." *Journal of Molecular Neuroscience: MN* 28(1): 3-15.
- Dere, E., Huston, JP., De Souza Silva, MA. (2007). "The pharmacology, neuroanatomy and neurogenetics of one-trial object recognition in rodents." *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 31(5): 673-704.
- Detke, M., Rickels, M., Lucki, I. (1995). "Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants." *Psychopharmacology* 121(1): 66-72.
- Deutch, A. (1992). "The regulation of subcortical dopamine systems by the prefrontal cortex: interactions of central dopamine systems and the pathogenesis of schizophrenia." *Journal of Neural Transmission. Supplementum* 36: 61-89.

Bibliografia

Dewachter, I., Ris, L., Jaworski, T., Seymour, CM., Kremer, A., Borghgraef, P., De Vijver, H., Godaux, E., Van Leuven, F. (2009). "GSK3 β , a centre-staged kinase in neuropsychiatric disorders, modulates long term memory by inhibitory phosphorylation at Serine-9." *Neurobiology of Disease* 35(2): 193-200.

Dhandapani, K., Brann, DW. (2002). "Protective effects of estrogen and selective estrogen receptor modulators in the brain." *Biology of Reproduction* 67(5): 1379-1385.

Di Paolo, T. (1994). "Modulation of brain dopamine transmission by sex steroids." *Reviews in the Neurosciences* 5(1): 27-41.

Di Paolo, T., Lévesque, D., Daigle, M. (1986). "A physiological dose of progesterone affects rat striatum biogenic amine metabolism." *European Journal of Pharmacology* 125(1): 11-16.

Di Paolo, T., Rouillard, C., Bédard, P. (1985). "17[beta]-estradiol at a physiological dose acutely increases dopamine turnover in rat brain." *European Journal of Pharmacology* 117(2): 197-203.

Diamond, S., Markham, CH., Hoehn, MM., McDowell, FH., Muentner, MD. (1990). "An examination of male-female differences in progression and mortality of Parkinson's disease." *Neurology* 40(5): 763-766.

Diers-Fenger, M., Kirchhoff, F., Kettenmann, H., Levine, JM., Trotter, J. (2001). "AN2/NG2 protein-expressing glial progenitor cells in the murine CNS: Isolation, differentiation, and association with radial glia." *Glia* 34(3): 213-228.

Dluzen, D., McDermott, JL., Liu, B. (1996). "Estrogen alters MPTP-induced neurotoxicity in female mice: effects on striatal dopamine concentrations and release." *Journal of Neurochemistry* 66(2): 658-666.

Bibliografia

- Dressing, G., Goldberg, J.E., Charles, N.J., Schwertfeger, K.L., Lange, C.A. (2011). "Membrane progesterone receptor expression in mammalian tissues: A review of regulation and physiological implications." *Steroids* 76(1-2): 11-17.
- Drexhage, R., Knijff, E.M., Padmos, R.C., Heul-Nieuwenhuijzen, L., Beumer, W., Versnel, M.A., Drexhage, H.A. (2010). "The mononuclear phagocyte system and its cytokine inflammatory networks in schizophrenia and bipolar disorder." *Expert Review of Neurotherapeutics* 10(1): 59-76.
- Du, B., Ohmichi, M., Takahashi, K., Kawagoe, J., Ohshima, C., Igarashi, H., Mori-Abe, A., Saitoh, M., Ohta, T., Ohishi, A., Doshida, M., Tezuka, N., Takahashi, T., Kurachi, H. (2004). "Both estrogen and raloxifene protect against beta-amyloid-induced neurotoxicity in estrogen receptor alpha-transfected PC12 cells by activation of telomerase activity via Akt cascade." *The Journal of Endocrinology* 183(3): 605-615.
- Dubois, R., Abramson, S.B., Crofford, L., Gupta, R.A., Simon, L.S., Van De Putte, L.B., Lipsky, P.E. (1998). "Cyclooxygenase in biology and disease." *The FASEB Journal* 12(12): 1063-1073.
- Duchesne, A., Dufresne, M.M., Sullivan, R.M. (2009). "Sex differences in corticolimbic dopamine and serotonin systems in the rat and the effect of postnatal handling." *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 33(2): 251-261.
- Dupont, A., Di Paolo, T., Gagné, B., Barden, N. (1981). "Effects of chronic estrogen treatment on dopamine concentrations and turnover in discrete brain nuclei of ovariectomized rats." *Neuroscience Letters* 22(1): 69-74.
- Durstewitz, D., Seamans, J.K. (2008). "The dual-state theory of prefrontal cortex dopamine function with relevance to catechol-o-methyltransferase genotypes and schizophrenia." *Biological Psychiatry* 64(9): 739-749.

Bibliografia

Einat, H., Yuan, P., Szabo, ST., Dogra, S., Manji, HK. (2007). "Protein kinase C inhibition by tamoxifen antagonizes manic-like behavior in rats: implications for the development of novel therapeutics for bipolar disorder." *Neuropsychobiology* 55(3-4): 123-131.

Ely, D., Dapper, V., Marasca, J., Corrêa, JB., Gamaro, GD., Xavier, MH., Michalowski, MB., Catelli, D., Rosat, R., Ferreira, MB., Dalmaz, C. (1997). "Effect of restraint stress on feeding behavior of rats." *Physiology & Behavior* 61(3): 395-398.

Emamian, E., Hall, D., Birnbaum, MJ., Karayiorgou, M., Gogos, JA. (2004). "Convergent evidence for impaired AKT1-GSK3 β signaling in schizophrenia." *Nature Genetics* 36(2): 131-137.

Ennaceur, A., Delacour, J. (1988). "A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data." *Behavioural Brain Research* 31(1): 47-59.

Ennaceur, A., Michalikova, S., Bradford, A., Ahmed, S. (2005). "Detailed analysis of the behavior of Lister and Wistar rats in anxiety, object recognition and object location tasks." *Behavioural Brain Research* 159(2): 247-266.

Estrada-Camarena, E., Fernandez-Guasti, A., Lopez-Rubalcava, C. (2003). "Antidepressant-like effect of different estrogenic compounds in the forced swimming test." *Neuropsychopharmacology* 28(5): 830-838.

Etgen, A., Garcia-Segura, LM. (2009). Estrogen regulation of neurotransmitter and growth factor signaling in the brain. *Hormones, Brain and Behavior*. Pfaff, DW., Arnold, AP., Fahrbach, SE., Etgen, ME., Rubin., RT. San Diego, Academic Press: 1121-1162.

Etgen, A., González-Flores, O., Todd, BJ. (2006). "The role of insulin-like growth factor-I and growth factor-associated signal transduction pathways in estradiol and progesterone facilitation of female reproductive behaviors." *Frontiers in Neuroendocrinology* 27(4): 363-375.

Bibliografia

Falconer, E., Galea, Liisa AM. (2003). "Sex differences in cell proliferation, cell death and defensive behavior following acute predator odor stress in adult rats." *Brain Research* 975(1-2): 22-36.

Falkenstein, E., Meyer, C., Eisen, C., Scriba, PC., Wehling, M. (1996). "Full-Length cDNA Sequence of a Progesterone Membrane-Binding Protein from Porcine Vascular Smooth Muscle Cells." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 229(1): 86-89.

Falkenstein, E., Heck, M., Gerdes, D., Grube, D., Christ, M., Weigel, M., Buddhikot, M., Meizel, S., Wehling, M. (1999). "Specific Progesterone Binding to a Membrane Protein and Related Nongenomic Effects on Ca^{2+} -Fluxes in Sperm." *Endocrinology* 140(12): 5999-6002.

Fan, X., Goff, DC., Henderson, DC. (2007). "Inflammation and schizophrenia." *Expert Review of Neurotherapeutics* 7(7): 789-796.

Fawcett, J., Asher, RA. (1999). "The glial scar and central nervous system repair." *Brain Research Bulletin* 49(6): 377-391.

Feinberg, I. (1982). "Schizophrenia: caused by a fault in programmed synaptic elimination during adolescence?" *Journal of Psychiatric Research* 17(4): 319-334.

Féltou, M., Vanhoutte, PM. (2006). "Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder (The Wiggers Award Lecture)." *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 291(3): H985-H1002.

Fernandez, S., Frick, KM. (2004). "Chronic oral estrogen affects memory and neurochemistry in middle-aged female mice." *Behavioural Neuroscience* 118(6): 1340-1351.

Bibliografia

Fortier, M., Joobar, R., Luheshi, GN., Boksa, P. (2004). "Maternal exposure to bacterial endotoxin during pregnancy enhances amphetamine-induced locomotion and startle responses in adult rat offspring." *Journal of Psychiatric Research* 38(3): 335-345.

Fortier, M., Luheshi, GN., Boksa, P. (2007). "Effects of prenatal infection on prepulse inhibition in the rat depend on the nature of the infectious agent and the stage of pregnancy." *Behavioural Brain Research* 181(2): 270-277.

Foy, M. R. (2001). "17beta-Estradiol: effect on CA1 hippocampal synaptic plasticity." *Neurobiology of Learning and Memory* 76(3): 239-252.

Frye, CA., Lacey, EH. (2001). "Posttraining androgens' enhancement of cognitive performance is temporally distinct from androgens' increases in affective behavior." *Cognitive, Affective & Behavioural Neuroscience* 1(2): 172-182.

Frye, CA., Seliga, AM. (2001). "Testosterone increases analgesia, anxiolysis, and cognitive performance of male rats." *Cognitive, Affective & Behavioural Neuroscience* 1(4): 371-381.

Frye, CA., Sumida, K., Dudek, B., Harney, J., Lydon, J., O'Malley, B., Pfaff, D., Rhodes, M. (2006). "Progesterone's effects to reduce anxiety behavior of aged mice do not require actions via intracellular progestin receptors." *Psychopharmacology* 186(3): 312-322.

Frye, CA., Walf, AA (2009). "Progesterone reduces depression-like behavior in a murine model of Alzheimer's Disease." *Age (Dordrecht, Netherlands)* 31(2): 143-153.

Frye, CA., Walf, AA. (2004). "Estrogen and/or progesterone administered systemically or to the amygdala can have anxiety-, fear-, and pain-reducing effects in ovariectomized rats." *Behavioural Neuroscience* 118(2): 306-313.

Bibliografia

Frye, CA., Walf, AA., Rhodes, ME.,Harney, JP. (2004). "Progesterone enhances motor, anxiolytic, analgesic, and antidepressive behavior of wild-type mice, but not those deficient in type 1 5 alpha-reductase." *Brain Research* 1004(1-2): 116-124.

Frye, CA., Wawrzycki, J. (2003). "Effect of prenatal stress and gonadal hormone condition on depressive behaviors of female and male rats." *Hormones and Behavior* 44(4): 319-326.

Fuchs, E., Czéh, B., Kole, MH., Michaelis, T., Lucassen, PJ. (2004). "Alterations of neuroplasticity in depression: the hippocampus and beyond." *European Neuropsychopharmacology: the Journal of the European College of Neuropsychopharmacology* 14 Suppl 5: S481-S490.

Fujita, Y., Ishima, T., Kunitachi, S., Hagiwara, H., Zhang, L.,Iyo, M.,Hashimoto, K. (2008). "Phencyclidine-induced cognitive deficits in mice are improved by subsequent subchronic administration of the antibiotic drug minocycline." *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 32(2): 336-339.

Gago, N., Akwa, Y., Sananès, N., Guennoun, R., Baulieu, EE., El-Etr, M., Schumacher, M. (2001). "Progesterone and the oligodendroglial lineage: Stage-dependent biosynthesis and metabolism." *Glia* 36(3): 295-308.

Gago, N., El-Etr, M., Sananès, N., Cadepond, F., Samuel, D., Avellana-Adalid, V., Baron-Van Evercooren, A., Schumacher, M. (2004). "3 α , 5 α -tetrahydroprogesterone (allopregnanolone) and γ -aminobutyric acid: Autocrine/paracrine interactions in the control of neonatal PSA-NCAM+ progenitor proliferation." *Journal of Neuroscience Research* 78(6): 770-783.

Galea, E., Santizo, R., Feinstein, DL., Adamsom, P., Greenwood, J., Koenig, HM., Pelligrino, DA. (2002). "Estrogen inhibits NF kappa B-dependent inflammation in brain endothelium without interfering with I kappa B degradation." *NeuroReport* 13(11): 1469-1472.

Bibliografia

Galimberti, D., Scarpini, E. (2011). "Inflammation and oxidative damage in Alzheimer's disease: friend or foe?" *Frontiers in Bioscience (Scholar Edition)* 3: 252-266.

Ganz, P. (2001). "Impact of tamoxifen adjuvant therapy on symptoms, functioning, and quality of life." *Journal of the National Cancer Institute. Monographs* 2001(30): 130-134.

Garcia-Segura, LM., Arévalo, MA., Azocitia, I. (2010). "Interactions of estradiol and insulin-like growth factor-I signalling in the nervous system: New advances." *Progress in Brain Research*. 181: 251-272.

Garcia-Segura, LM., Azcoitia, I., DonCarlos, LL. (2001). "Neuroprotection by estradiol." *Progress in Neurobiology* 63(1): 29-60.

Garcia-Segura, LM., Melcangi, RC. (2006). "Steroids and glial cell function." *Glia* 54(6): 485-498.

Gayle, D., Beloosesky, R., Desai, M., Amidi, F., Nuñez, SE., Ross, MG. (2004). "Maternal LPS induces cytokines in the amniotic fluid and corticotropin releasing hormone in the fetal rat brain." *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 286(6): R1024-R1029.

Geary, N., Trace, D., Smith, GP. (1995). "Estradiol interacts with gastric or postgastric food stimuli to decrease sucrose ingestion in ovariectomized rats." *Physiology & Behavior* 57(1): 155-158.

Ghoumari, A., Baulieu, EE., Schumacher, M. (2005). "Progesterone increases oligodendroglial cell proliferation in rat cerebellar slice cultures." *Neuroscience* 135(1): 47-58.

Bibliografia

Girard, S., Tremblay, L., Lepage, M., Sébire, G. (2010). "IL-1 receptor antagonist protects against placental and neurodevelopmental defects induced by maternal inflammation." *The Journal of Immunology* 184(7): 3997-4005.

Glantz, L., Gilmore, JH., Overstreet, DH., Salimi, K., Lieberman, JA., Jarskog, LF. (2010). "Pro-apoptotic Par-4 and dopamine D2 receptor in temporal cortex in schizophrenia, bipolar disorder and major depression." *Schizophrenia research* 118(1): 292-299.

Goekoop, R., Barkhof, F., Duschek, EJ., Netelenbos, C., Knol, DL., Scheltens, P., Rombouts, SA. (2005). "Raloxifene treatment enhances brain activation during recognition of familiar items: a pharmacological fMRI study in healthy elderly males." *Neuropsychopharmacology* 31(7): 1508-1518.

Gogos, A., Kwek, P., van den Buuse, M. (2011). "The role of estrogen and testosterone in female rats in behavioral models of relevance to schizophrenia." *Psychopharmacology*: 1-12.

Gogos, A., Nathan, PJ., Guille, V., Croft, RJ., van den Buuse, M. (2005). "Estrogen prevents 5-HT1A receptor-induced disruptions of prepulse inhibition in healthy women." *Neuropsychopharmacology* 31(4): 885-889.

Gogos, A., Van den Buuse, M. (2004). "Estrogen and progesterone prevent disruption of prepulse inhibition by the serotonin-1A receptor agonist 8-hydroxy-2-dipropylaminotetralin." *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 309(1): 267-274.

Gogtay, N., Giedd, JN., Lusk, L., Hayashi, KM., Greenstein, D., Vaituzis, AC., Nugent, TF3rd., Herman, DH., Clasen, LS., Toga, AW., Rapoport, JL., Thompson, PM. (2004). "Dynamic mapping of human cortical development during childhood through early adulthood." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(21): 8174-8179.

Bibliografia

Gold, P., Chrousos, GP. (2002). "Organization of the stress system and its dysregulation in melancholic and atypical depression: high vs low CRH/NE states." *Molecular Psychiatry* 7(3): 254-275.

Goldstein, J., Link, BG. (1988). "Gender and the expression of schizophrenia." *Journal of Psychiatric Research* 22(2): 141-155.

Gonzales, K., Tetel, MJ., Wagner, CK. (2008). "Estrogen receptor (ER) β modulates ER α responses to estrogens in the developing rat ventromedial nucleus of the hypothalamus." *Endocrinology* 149(9): 4615-21.

Goodman, Y., Bruce, AJ., Cheng, B., Mattson, MP. (1996). "Estrogens attenuate and corticosterone exacerbates excitotoxicity, oxidative injury, and amyloid β -peptide toxicity in hippocampal neurons." *Journal of Neurochemistry* 66(5): 1836-1844.

Goshen, I., Kreisel, T., Ben-Menachem-Zidon, O., Licht, T., Weidenfeld, J., Ben-Hur, T., Yirmiya, R. (2007). "Brain interleukin-1 mediates chronic stress-induced depression in mice via adrenocortical activation and hippocampal neurogenesis suppression." *Molecular Psychiatry* 13(7): 717-728.

Grandbois, M., Morissette, M., Callier, S., Di Paolo, T. (2000). "Ovarian steroids and raloxifene prevent MPTP-induced dopamine depletion in mice." *Neuroreport* 11(2): 343-346.

Grayson, B., Idris, NF., Neill, JC. (2007). "Atypical antipsychotics attenuate a sub-chronic PCP-induced cognitive deficit in the novel object recognition task in the rat." *Behavioural Brain Research* 184(1): 31-38.

Green, S., Walter, P., Kumar, V., Krust, A., Bornert, JM., Argos, P., Chambon, P. (1986). "Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A." *Nature* 320(6058): 134-139.

Bibliografia

- Greenamyre, J., Young, AB. (1989). "Excitatory amino acids and Alzheimer's disease." *Neurobiology of Aging* 10(5): 593-602.
- Gresack, J., Frick, KM. (2004). "Environmental enrichment reduces the mnemonic and neural benefits of estrogen." *Neuroscience* 128(3): 459-471.
- Grønli, J., Murison, R., Bjorvatn, B., Sørensen, E., Portas, CM., Ursin, R. (2004). "Chronic mild stress affects sucrose intake and sleep in rats." *Behavioural Brain Research* 150(1-2): 139-147.
- Guenoun, R., Meffre, D., Labombarda, F., Gonzalez, SL., Deniselle, MC., Stein, DG., De Nicola, AF., Schumacher, M. (2008). "The membrane-associated progesterone-binding protein 25-Dx: Expression, cellular localization and up-regulation after brain and spinal cord injuries." *Brain Research Reviews* 57(2): 493-505
- Guerra, B., Díaz, M., Alonso, R., Marin, R. (2004). "Plasma membrane oestrogen receptor mediates neuroprotection against β -amyloid toxicity through activation of Raf-1/MEK/ERK cascade in septal-derived cholinergic SN56 cells." *Journal of Neurochemistry* 91(1): 99-109.
- Häfner, H. (2003). "Gender differences in schizophrenia." *Psychoneuroendocrinology* 28(Supplement 2): 17-54.
- Häfner, H., Behrens, S., De Vry, J., Gattaz, WF. (1991). "An animal model for the effects of estradiol on dopamine-mediated behavior: Implications for sex differences in schizophrenia." *Psychiatry Research* 38(2): 125-134.
- Hamilton, M. (1967). "Development of a rating scale for primary depressive illness." *The British Journal of Social and Clinical Psychology* 6(4): 278-296.

Bibliografia

Harley, C., Malsbury, CW., Squires, A., Brown, RA. (2000). "Testosterone decreases CA1 plasticity in vivo in gonadectomized male rats." *Hippocampus* 10(6): 693-697.

Hashimoto, K., Fujita, Y., Shimizu, E., Iyo, M. (2005). "Phencyclidine-induced cognitive deficits in mice are improved by subsequent subchronic administration of clozapine, but not haloperidol." *European Journal of Pharmacology* 519(1-2): 114-117.

Hashimoto, K., Fujita, Y., Shimizu, E., Iyo, M. (2005). "Phencyclidine-induced cognitive deficits in mice are improved by subsequent subchronic administration of clozapine, but not haloperidol." *European Journal of Pharmacology* 519(1-2): 114-117.

Hazell, G., Yao, ST., Roper, JA., Prossnitz, ER., O'Carroll, AM., Lolait, SJ. (2009). "Localisation of GPR30, a novel G protein-coupled oestrogen receptor, suggests multiple functions in rodent brain and peripheral tissues." *Journal of Endocrinology* 202(2): 223-236.

Heisters, D. (2011). "Parkinson's: symptoms, treatments and research." *British Journal of Nursing* (Mark Allen Publishing) 20(9): 548-554.

Henderson, V. (1997). "The epidemiology of estrogen replacement therapy and Alzheimer's disease." *Neurology* 48(5 Suppl 7): S27-35.

Henderson, V., Paganini-Hill, A., Emanuel, CK., Dunn, ME., Buckwalter, JG. (1994). "Estrogen replacement therapy in older women: comparisons between alzheimer's disease cases and nondemented control subjects." *Archives of Neurology* 51(9): 896-900.

Hendrick, V., Altshuler, LL., Burt, VK. (1996). "Course of psychiatric disorders across the menstrual cycle." *Harvard Review of Psychiatry* 4(4): 200-207.

Hendrick, V., Altshuler, LL., Suri, R. (1998). "Hormonal changes in the postpartum and implications for postpartum depression." *Psychosomatics* 39(2): 93-101.

Bibliografia

Henrion, D., Dechaux, E., Dowell, FJ., MacIour, J., Samuel, JL., Lévy, BI., Michel, JB. (1997). "Alteration of flow-induced dilatation in mesenteric resistance arteries of L-NAME treated rats and its partial association with induction of cyclo-oxygenase-2." *British Journal of Pharmacology* 121(1): 83-90.

Hetman, M., Cavanaugh, JE., Kimelman, D., Xia, Z. (2000). "Role of Glycogen Synthase Kinase-3 β in neuronal apoptosis induced by trophic withdrawal." *The Journal of Neuroscience* 20(7): 2567-2574.

Hirahara, Y., Matsuda, KI., Gao, W., Arvanitis, DN., Kawata, M., Boggs, JM. (2009). "The localization and non-genomic function of the membrane-associated estrogen receptor in oligodendrocytes." *Glia* 57(2): 153-165.

Hlatky, M., Boothroyd, D., Vittinghoff, E., Sharp, P., Whooley, MA.; Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study (HERS) Research Group. (2002). "Quality-of-life and depressive symptoms in postmenopausal women after receiving hormone therapy." *JAMA: The Journal of the American Medical Association* 287(5): 591-597.

Hu, J., Ma, YH., Jiang, J., Yang, N., Duan, SH., Jiang, ZH., Mei, ZT., Fei, J., Guo, LH. (2004). "Cognitive impairment in mice over-expressing gamma-aminobutyric acid transporter I (GAT1)." *Neuroreport* 15(1): 9-12.

Ibi, D., Nagai, T., Kitahara, Y., Mizoguchi, H., Koike, H., Shiraki, A., Takuma, K., Kamei, H., Noda, Y., Nitta, A., Nabeshima, T., Yoneda, Y., Yamada, K. (2009). "Neonatal polyI:C treatment in mice results in schizophrenia-like behavioral and neurochemical abnormalities in adulthood." *Neuroscience Research* 64(3): 297-305.

Ito, A., Bebo, BFJr., Matejuk, A., Zamora, A., Silverman, M., Fyfe-Johnson, A., Offner, H. (2001). "Estrogen treatment down-regulates TNF- α production and reduces the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis in cytokine knockout mice." *The Journal of Immunology* 167(1): 542-552.

Bibliografia

Ito, H., Smith, SE., Hsiao, E., Patterson, PH. (2010). "Maternal immune activation alters nonspatial information processing in the hippocampus of the adult offspring." *Brain, Behavior, and Immunity* 24(6): 930-941.

Jarkova, N., Martenyi, F., Masanauskaite, D., Walls, EL., Smetnik, VP., Pavo, I., (2002). "Mood effect of raloxifene in postmenopausal women." *Maturitas* 42(1): 71-75.

Jiang, H., Chang, DM. (1999). "Non-steroidal anti-inflammatory drugs with adverse psychiatric reactions: five case reports." *Clinical Rheumatology* 18(4): 339-345.

Jones, E. (1995). "Cortical development and neuropathology in schizophrenia." *Ciba Foundation Symposium*(193): 277-295.

Jope, R., Roh, MS. (2006). "Glycogen Synthase Kinase-3 (GSK3) in psychiatric diseases and therapeutic interventions." *Current Drug Targets* 7(11): 1421-1434.

Juge-Aubry, C., Somm, E., Giusti, V., Pernin, A., Chicheportiche, R., Verdumo, C., Rohner-Jeanrenaud, F., Burger, D., Dayer, JM., Meier, CA. (2003). "Adipose tissue is a major source of interleukin-1 receptor antagonist." *Diabetes* 52(5): 1104-1110.

Kalita, K., Szymczak, S., Kaczmarek, L. (2005). "Non-nuclear estrogen receptor β and α in the hippocampus of male and female rats." *Hippocampus* 15(3): 404-412.

Kaneda, Y., Ohmori, T. (2005). "Relation Between Estradiol and Negative Symptoms in Men With Schizophrenia." *The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences* 17(2): 239-242.

Kang, U., Seo, MS., Roh, MS., Kim, Y., Yoon, SC., Kim, YS. (2004). "The effects of clozapine on the GSK-3-mediated signaling pathway." *FEBS Letters* 560(1-3): 115-119.

Bibliografia

Karahancer, M., Cirpan, T., Kanit, L., Terek, M.C., Dikmen, Y., Ozsener, S., (2008). "The effects of raloxifen on depression and cognition in ovariectomized rats." *Fertility and Sterility* 89(1): 240-242.

Karsidag, A., Karsidag, C., Buyukbayrak, EE., Kars, B., Pirimoglu, M., Unal, O., Turan, MC., (2010). "Raloxifene: is it really effective on mood changes in postmenopausal osteopenic women?" *Journal of Psychosomatic Obstetrics and Gynecology* 31 (4): 273-278.

Kazakova, S., Fedotova, IuO., Sapronov, NS. (2007). "Effect of tamoxifen on anxiety in ovariectomized and intact female rats." *Eksperimental'naia I Klinicheskaia Farmakologiya* Sep-Oct; 70(5): 3-8.

Keirstead, H., Levine, JM., Blakemore, WF. (1998). "Response of the oligodendrocyte progenitor cell population (defined by NG2 labelling) to demyelination of the adult spinal cord." *Glia* 22(2): 161-170.

Keller, J., Germeyer, A., Begley, JG., Mattson, MP. (1997). "17 β -Estradiol attenuates oxidative impairment of synaptic Na⁺/K⁺-ATPase activity, glucose transport, and glutamate transport induced by amyloid β -peptide and iron." *Journal of Neuroscience Research* 50(4): 522-530.

Kellogg, C., Barrett, KA. (1999). "Reduced progesterone metabolites are not critical for plus-maze performance of lactating female rats." *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 63(3): 441-448.

Kelly, M., Rønnekleiv, OK. (2008). "Membrane-initiated estrogen signaling in hypothalamic neurons." *Molecular and Cellular Endocrinology* 290(1-2): 14-23.

Kendell, R., Chalmers, JC., Platz, C. (1987). "Epidemiology of puerperal psychoses." *The British Journal of Psychiatry* 150:662-73.

Bibliografia

Kenney, N., Mook, DG. (1974). "Effects of ovariectomy on meal pattern in the albino rat." *Journal of Comparative and Physiological Psychology* 87(2): 302-309.

Kessler, R. (1997). "The effects of stressful life events on depression." *Annual Review of Psychology* 48(1): 191-214.

Kessler, R., McGonagle, KA., Zhao, S., Nelson, CB., Hughes, M., Eshleman, S., Wittchen, HU., Kendler, KS. (1994). "Lifetime and 12-month prevalence of DSM-III-R psychiatric disorders in the United States. Results from the National Comorbidity Survey." *Archives of General Psychiatry* 51(1): 8-19.

Kim, J., Duan, X., Liu, CY., Jang, MH., Guo, JU., Pow-Anpongkul, N., Kang, E., Song, H., Ming, GL. (2009). "DISC1 regulates new neuron development in the adult brain via modulation of AKT-mTOR signaling through KIAA1212." *Neuron* 63(6): 761-773.

Kim, Y., Kim, L., Lee, MS. (2000). "Relationships between interleukins, neurotransmitters and psychopathology in drug-free male schizophrenics." *Schizophrenia Research* 44(3): 165-175.

Kipp, M., Karakaya, S., Pawlak, J., Araujo-Wright, G., Arnold, S., Beyer, C. (2006). "Estrogen and the development and protection of nigrostriatal dopaminergic neurons: Concerted action of a multitude of signals, protective molecules, and growth factors." *Frontiers in Neuroendocrinology* 27(4): 376-390.

Kireev, R., Tresguerres, AC., Garcia, C., Borrás, C., Ariznavarreta, C., Vara, E., Vina, J., Tresguerres, JA. (2010). "Hormonal regulation of pro-inflammatory and lipid peroxidation processes in liver of old ovariectomized female rats." *Biogerontology* 11(2): 229-243.

Konecna, L., Yan, MS., Miller, LE., Schölmerich, J., Falk, W., Straub, RH. (2000). "Modulation of IL-6 production during the menstrual cycle in vivo and in vitro." *Brain, Behavior, and Immunity* 14(1): 49-61.

Bibliografia

- Koss, W., Gehlert, DR., Shekhar, A. (2004). "Different effects of subchronic doses of 17-beta estradiol in two ethologically based models of anxiety utilizing female rats." *Hormones and Behavior* 46(2): 158-164.
- Kritzer, M., Creutz, LM. (2008). "Region and sex differences in constituent dopamine neurons and immunoreactivity for intracellular estrogen and androgen receptors in mesocortical projections in rats." *The Journal of Neuroscience* 28(38): 9525-9535.
- Kritzer, M., McLaughlin, PJ., Smirlis, T., Robinson, JK. (2001). "Gonadectomy impairs T-maze acquisition in adult male rats." *Hormones and Behavior* 39(2): 167-174.
- Krystal, J., Karper, LP., Seibyl, JP., Freeman, GK., Delaney, R., Bremner, JD., Heninger, GR., Bowers, MB Jr., Charney, DS. (1994). "Subanesthetic effects of the noncompetitive NMDA antagonist, ketamine, in humans: psychotomimetic, perceptual, cognitive, and neuroendocrine responses." *Archives of General Psychiatry* 51(3): 199-214.
- Kuiper, G., Enmark, E., Peltö-Huikko, M., Nilsson, S., Gustafsson, JA. (1996). "Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93(12): 5925-5930.
- Kulkarni, J., de Castella, A., Headey, B., Marston, N., Sinclair, K., Lee, S., Gurvich, C., Fitzgerald, PB., Burger, H. (2011). "Estrogens and men with schizophrenia: Is there a case for adjunctive therapy?" *Schizophrenia Research* 125(2-3):278-83
- Kulkarni, J., Garland, KA., Scaffidi, A., Headey, B., Anderson, R., de Castella, A., Fitzgerald, P., Davis, SR. (2006). "A pilot study of hormone modulation as a new treatment for mania in women with bipolar affective disorder." *Psychoneuroendocrinology* 31(4): 543-547.
- Kulkarni, J., Riedel, A., de Castella, AR., Fitzgerald, PB., Rolfe, TJ., Taffe, J., Burger, H. (2001). "Estrogen- a potential treatment for schizophrenia." *Schizophrenia Research* 48(1): 137-144.

Bibliografia

Kulkarni, J., Riedel, A., de Castella, A.R., Fitzgerald, P.B., Rolfe, T.J., Taffe, J., Burger, H. (2002). "A clinical trial of adjunctive oestrogen treatment in women with schizophrenia." *Archives of Women's Mental Health* 5(3): 99-104.

Kumari, V., Soni, W., Sharma, T. (1999). "Normalization of information processing deficits in schizophrenia with clozapine." *The American Journal of Psychiatry* 156(7): 1046-1051.

Kwon, M., Seo, Y.J., Lee, J.K., Lee, H.K., Jung, J.S., Jang, J.E., Park, S.H., Suh, H.W. (2008). "The repeated immobilization stress increases IL-1[β] immunoreactivities in only neuron, but not astrocyte or microglia in hippocampal CA1 region, striatum and paraventricular nucleus." *Neuroscience Letters* 430(3): 258-263.

Labombarda, F., González, S., Lima, A., Roig, P., Guennoun, R., Schumacher, M., De Nicola, A.F. (2011). "Progesterone attenuates astro- and microgliosis and enhances oligodendrocyte differentiation following spinal cord injury." *Experimental Neurology* 231(1): 135-146.

Lagace, D., Fischer, S.J., Eisch, A.J. (2007). "Gender and endogenous levels of estradiol do not influence adult hippocampal neurogenesis in mice." *Hippocampus* 17(3): 175–180.

Lagunas, N., Calmarza-Font, I., Grassi, D., Garcia-Segura, L.M. (2011). "Estrogen receptor ligands counteract cognitive deficits caused by androgen deprivation in male rats." *Hormones and Behavior* 59(4): 581-584.

Lahti, A., Koffel, B., LaPorte, D., Tamminga, C.A. (1995). "Subanesthetic doses of ketamine stimulate psychosis in schizophrenia." *Neuropsychopharmacology* 13(1): 9-19.

Lange, C. (2008). "Integration of progesterone receptor action with rapid signaling events in breast cancer models." *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 108(3-5): 203-212.

Bibliografia

Lange, C., Richer, JK., Shen, T., Horwitz, KB. (1998). "Convergence of progesterone and epidermal growth factor signaling in breast cancer." *Journal of Biological Chemistry* 273(47): 31308-31316.

Lanté, F., Meunier, J., Guiramand, J., Maurice, T., Cavalier, M., de Jesus Ferreira, MC., Aimar, R., Cohen-Solal, C., Vignes, M., Barbanel, G. (2007). "Neurodevelopmental damage after prenatal infection: Role of oxidative stress in the fetal brain." *Free Radical Biology and Medicine* 42(8): 1231-1245.

Laruelle, M., Abi-Dargham, A. (1999). "Dopamine as the wind of the psychotic fire: new evidence from brain imaging studies." *Journal of Psychopharmacology* 13(4): 358-371.

Laruelle, M., Abi-Dargham, A., van Dyck, CH., Gil, R., D'Souza, CD., Erdos, J., McCance, E., Rosenblatt, W., Fingado, C., Zoghbi, SS., Baldwin, RM., Seibyl, JP., Krystal, JH., Charney, DS., Innis RB. (1996). "Single photon emission computerized tomography imaging of amphetamine-induced dopamine release in drug-free schizophrenic subjects." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93(17): 9235-9240.

Laruelle, M., Abi-Dargham, A., Gil, R., Kegeles, L., Innis, R. (1999). "Increased dopamine transmission in schizophrenia: relationship to illness phases." *Biological psychiatry* 46(1): 56-72.

Lebesgue, D., Chevalleyre, V., Zukin, RS., Etgen, AM. (2009). "Estradiol rescues neurons from global ischemia-induced cell death: Multiple cellular pathways of neuroprotection." *Steroids* 74(7): 555-561.

Lee, K., Ray, GT., Hunkeler, EM., Finley, PR. (2007). "Tamoxifen treatment and new-onset depression in breast cancer patients." *Psychosomatics* 48(3): 205-210.

Leonhardt, S., Boonyaratanakornkit, V., Edwards, DP. (2003). "Progesterone receptor transcription and non-transcription signaling mechanisms." *Steroids* 68(10-13): 761-770.

Bibliografia

Leranth, C., Roth, R.H., Elsworth, J.D., Naftolin, F., Horvath, T.L., Redmond, D.E.Jr. (2000). "Estrogen is essential for maintaining nigrostriatal dopamine neurons in primates: implications for Parkinson's disease and memory." *The Journal of Neuroscience* 20(23): 8604-8609.

Lévesque, D., Di Paolo, T. (1993). "Modulation by estradiol and progesterone of the GTP effect on striatal D-2 dopamine receptors." *Biochemical Pharmacology* 45(3): 723-733.

Lévesque, D., Gagnon, S., Di Paolo, T. (1989). "Striatal D1 dopamine receptor density fluctuates during the rat estrous cycle." *Neuroscience Letters* 98(3): 345-350.

Levine, J., Reynolds, R., Fawcett, J.W. (2001). "The oligodendrocyte precursor cell in health and disease." *Trends in Neurosciences* 24(1): 39-47.

Levine, J., Stincone, F., Lee, Y.S. (1993). "Development and differentiation of glial precursor cells in the rat cerebellum." *Glia* 7(4): 307-321.

Li, C., Brake, W.G., Romeo, R.D., Dunlop, J.C., Gordon, M., Buzescu, R., Magarinos, A.M., Allen, P.B., Greengard, P., Luine, V., McEwen, B.S. (2004). "Estrogen alters hippocampal dendritic spine shape and enhances synaptic protein immunoreactivity and spatial memory in female mice." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(7): 2185-2190.

Li, S., Ballou, L.R., Morham, S.G., Blatteis, C.M. (2001). "Cyclooxygenase-2 mediates the febrile response of mice to interleukin-1 beta]" *Brain Research* 910(1-2): 163-173.

Li, X., Rosborough, K.M., Friedman, A.B., Zhu, W., Roth, K.A. (2007). "Regulation of mouse brain glycogen synthase kinase-3 by atypical antipsychotics." *The International Journal of Neuropsychopharmacology* 10(1): 7-19.

Bibliografia

- Li, Y., Ji, YJ., Jiang, H., Liu, DX., Zhang, Q., Fan, SJ., Pan, F. (2009). "Effects of unpredictable chronic stress on behavior and brain-derived neurotrophic factor expression in CA3 subfield and dentate gyrus of the hippocampus in different aged rats." *Chinese Medical Journal* 122(13): 1564-1569.
- Liang, S., Byers, DM., Irwin, LN. (2007). "Chronic mild stressors and diet affect gene expression differently in male and female rats." *Journal of Molecular Neuroscience* 33(2): 189-200.
- Liao, S., Chen, WY., Chen, CJ. (2002). "Estrogen attenuates tumor necrosis factor-[alpha] expression to provide ischemic neuroprotection in female rats." *Neuroscience Letters* 330(2): 159-162.
- Lightfoot, J. (2008). "Sex hormones' regulation of rodent physical activity: a review." *International Journal of Biological Sciences* 4(3): 126-132.
- Ling, Z., Chang, QA., Tong, CW., Leurgans, SE., Lipton, JW., Carvey, PM. (2004). "Rotenone potentiates dopamine neuron loss in animals exposed to lipopolysaccharide prenatally." *Experimental Neurology* 190(2): 373-383.
- Ling, Z., Gayle, DA., Ma, SY., Lipton, JW., Tong, CW., Hong, JS., Carvey, PM. (2002). "In utero bacterial endotoxin exposure causes loss of tyrosine hydroxylase neurons in the postnatal rat midbrain." *Movement Disorders* 17(1): 116-124.
- Ling, Z., Zhu, Y., Tong, CW., Snyder, JA., Lipton, JW., Carvey, PM. (2009). "Prenatal lipopolysaccharide does not accelerate progressive dopamine neuron loss in the rat as a result of normal aging." *Experimental Neurology* 216(2): 312-320.
- Liu, B., Dluzen, DE. (2007). "Oestrogen and nigrostriatal dopaminergic neurodegeneration: animal models and clinical reports of Parkinson's disease." *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 34(7): 555-565.

Bibliografía

Liu, F., Day, M., Muñoz, LC., Bitran, D., Arias, R., Revilla-Sanchez, R., Grauer, S., Zhang, G., Kelley, C., Pulito, V., Sung, A., Mervis, RF., Navarra, R., Hirst, WD., Reinhart, PH., Marquis, KL., Moss, SJ., Pangalos, MN., Brandon, NJ. (2008). "Activation of estrogen receptor-beta regulates hippocampal synaptic plasticity and improves memory." *Nature Neuroscience* 11(3): 334-343.

Liverman, C., Kaftan, HA., Cui, L., Hersperger, SG., Taboada, E., Klein, RM., Berman, NE. (2006). "Altered expression of pro-inflammatory and developmental genes in the fetal brain in a mouse model of maternal infection." *Neuroscience Letters* 399(3): 220-225.

Lonkar, P., Dedon, PC. (2011). "Reactive species and DNA damage in chronic inflammation: reconciling chemical mechanisms and biological fates." *International Journal of Cancer* 128(9): 1999-2009.

Lovestone, S., Killick, R., Di Forti, M., Murray, R. (2007). "Schizophrenia as a GSK-3 dysregulation disorder." *Trends in Neurosciences* 30(4): 142-149.

Lowe, G., Luheshi, GN., Williams, S. (2008). "Maternal infection and fever during late gestation are associated with altered synaptic transmission in the hippocampus of juvenile offspring rats." *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 295(5): R1563-R1571.

Luine, V., Mc Ewen, BS. (1977). "Effect of oestradiol on turnover of type A monoamine oxidase in brain." *Journal of Neurochemistry* 28(6): 1221-1227.

Lyons, K., Hubble, JP., Tröster, AI., Pahwa, R., Koller, WC. (1998). "Gender differences in Parkinson's disease." *Clinical Neuropharmacology* 21(2): 118-121.

Ma, Y., Zhou, XG., Duan, SH., Hu, JH., Lu, BF., Yu, Y., Mei, ZT., Fei, J., Guo, LH. (2001). "Overexpression of gamma-aminobutyric acid transporter subtype I leads to cognitive deterioration in transgenic mice." *Acta Pharmacologica Sinica* 22(4): 340-348.

Bibliografia

- Maes, M. (1999). "Major depression and activation of the inflammatory response system." *Advances in Experimental Medicine and Biology* 461: 25-46.
- Maes, M., Bosmans, E., Calabrese, J., Smith, R., Meltzer, HY. (1995). "Interleukin-2 and interleukin-6 in schizophrenia and mania: Effects of neuroleptics and mood stabilizers." *Journal of Psychiatric Research* 29(2): 141-152.
- Maes, M., Bosmans, E., Kenis, G., De Jong, R., Smith, RS., Meltzer, HY. (1997). "In vivo immunomodulatory effects of clozapine in schizophrenia." *Schizophrenia Research* 26(2): 221-225.
- Maes, M., Bosmans, E., Ranjan, R., Vandoolaeghe, E., Meltzer, HY., De Ley, M., Berghmans, R., Stans, G., Desnyder, R. (1996). "Lower plasma CC16, a natural anti-inflammatory protein, and increased plasma interleukin-1 receptor antagonist in schizophrenia: effects of antipsychotic drugs." *Schizophrenia Research* 21(1): 39-50.
- Maes, M., Song, C., Lin, AH., Bonaccorso, S., Kenis, G., De Jongh, R., Bosmans, E., Scharpé, S. (1999). "Negative immunoregulatory effects of antidepressants: inhibition of interferon-gamma and stimulation of interleukin-10 secretion." *Neuropsychopharmacology* 20(4): 370-379.
- Maguire, J., Mody, I. (2008). "GABAAR plasticity during pregnancy: relevance to postpartum depression." *Neuron* 59(2): 207-213.
- Maida, M., Hurley, SD., Daeschner, JA., Moore, AH., O'Banion, MK. (2006). "Cytosolic prostaglandin E2 synthase (cPGES) expression is decreased in discrete cortical regions in psychiatric disease." *Brain Research* 1103(1): 164-172.
- Majewska, M., Vaupel, DB. (1991). "Steroid control of uterine motility via gamma-aminobutyric acidA receptors in the rabbit: a novel mechanism?" *The Journal of Endocrinology* 131(3): 427-434.

Bibliografia

Mällo, T., Matrov, D., Kõiv, K., Harro, J. (2009). "Effect of chronic stress on behavior and cerebral oxidative metabolism in rats with high or low positive affect." *Neuroscience* 164(3): 963-974.

Mallon, B., Shick, HE., Kidd, GJ., Macklin, WB. (2002). "Proteolipid Promoter Activity Distinguishes Two Populations of NG2-Positive Cells throughout Neonatal Cortical Development." *The Journal of Neuroscience* 22(3): 876-885.

Mannella, P., Brinton, RD. (2006). "Estrogen receptor protein interaction with phosphatidylinositol 3-kinase leads to activation of phosphorylated Akt and extracellular signal-regulated kinase 1/2 in the same population of cortical neurons: a unified mechanism of estrogen action." *The Journal of Neuroscience* 26(37): 9439-9447.

Manning, E., Ransome, MI., Burrows, EL., Hannan, AJ. (2010). "Increased adult hippocampal neurogenesis and abnormal migration of adult-born granule neurons is associated with hippocampal-specific cognitive deficits in phospholipase C- β 1 knockout mice." *Hippocampus*. doi: 10.1002/hipo.20900

Marin, R., Guerra, B., Alonso, R., Ramírez, CM., Díaz, M. (2005). "Estrogen activates classical and alternative mechanisms to orchestrate neuroprotection." *Current Neurovascular Research* 2(4): 287-301.

Markham, J., Morris, JR., Juraska, JM. (2007). "Neuron number decreases in the rat ventral, but not dorsal, medial prefrontal cortex between adolescence and adulthood." *Neuroscience* 144(3): 961-968.

Markham, J., Taylor, AR., Taylor, SB., Bell, DB., Koenig, JI. (2010). "Characterization of the cognitive impairments induced by prenatal exposure to stress in the rat." *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 4:173

Markowska, A., Mooney, M., Sonntag, WE. (1998). "Insulin-like growth factor-1 ameliorates age-related behavioral deficits." *Neuroscience* 87(3): 559-569.

Bibliografia

- Martinez, F., Hermel, ES., Xavier, LL., Viola, GG., Riboldi, J., Rasia-Filho, AA., Achaval, M. (2006). "Gonadal hormone regulation of glial fibrillary acidic protein immunoreactivity in the medial amygdala subnuclei across the estrous cycle and in castrated and treated female rats." *Brain Research* 1108(1): 117-126.
- Martínez-Mota, L., Contreras, CM., Saavedra, M. (1999). "Progesterone reduces immobility in rats forced to swim." *Archives of Medical Research* 30(4): 286-289.
- Matejuk, A., Adlard, K., Zamora, A., Silverman, M., Vandembark, AA., Offner, H. (2001). "17 β -estradiol inhibits cytokine, chemokine, and chemokine receptor mRNA expression in the central nervous system of female mice with experimental autoimmune encephalomyelitis." *Journal of Neuroscience Research* 65(6): 529-542.
- Mattson, M. (2000). "Apoptosis in neurodegenerative disorders." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 1(2): 120-130.
- McCarthy, M., Wright, CL., Schwarz, JM. (2009). "New tricks by an old dogma: Mechanisms of the Organizational / Activational hypothesis of steroid-mediated sexual differentiation of brain and behavior." *Hormones and Behavior* 55(5): 655-665.
- McEwen, B. (1976). "Interactions between hormones and nerve tissue." *Scientific American* 235(1): 48-58.
- Mellon, S. (2007). "Neurosteroid regulation of central nervous system development." *Pharmacology & Therapeutics* 116(1): 107-124.
- Mellon, S., Griffin, LD. (2002). "Neurosteroids: biochemistry and clinical significance." *Trends in Endocrinology and Metabolism* 13(1): 35-43.
- Mendez, P., Azcoitia, I., Garcia-Segura, LM. (2003). "Estrogen receptor alpha forms estrogen-dependent multimolecular complexes with insulin-like growth factor receptor and

Bibliografia

phosphatidylinositol 3-kinase in the adult rat brain." *Molecular Brain Research* 112(1-2): 170-176.

Mendez, P., Wandosell, F., Garcia-Segura, LM. (2006). "Cross-talk between estrogen receptors and insulin-like growth factor-I receptor in the brain: Cellular and molecular mechanisms." *Frontiers in Neuroendocrinology* 27(4): 391-403.

Meyer, U., Feldon, J. (2009). "Neural basis of psychosis-related behaviour in the infection model of schizophrenia." *Behavioural Brain Research* 204(2): 322-334.

Meyer, U., Nyffeler, M., Yee, BK., Knuesel, I., Feldon, J. (2008). "Adult brain and behavioral pathological markers of prenatal immune challenge during early/middle and late fetal development in mice." *Brain, Behavior, and Immunity* 22(4): 469-486.

Meyer, U., Schwarz, MJ., Müller, N. (2011). "Inflammatory processes in schizophrenia: A promising neuroimmunological target for the treatment of negative/cognitive symptoms and beyond." *Pharmacology & Therapeutics* 132(1): 96-110.

Mhyre, A., Dorsa, DM. (2006). "Estrogen activates rapid signaling in the brain: Role of estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta in neurons and glia." *Neuroscience* 138(3): 851-858.

Micevych, P., Dominguez, R. (2009). "Membrane estradiol signaling in the brain." *Frontiers in Neuroendocrinology* 30(3): 315-327.

Micevych, P., Mermelstein, P. (2008). "Membrane estrogen receptors acting through metabotropic glutamate receptors: an emerging mechanism of estrogen action in brain." *Molecular Neurobiology* 38(1): 66-77.

Micevych, P., Sinchak, K. (2008). "Estradiol regulation of progesterone synthesis in the brain." *Molecular and Cellular Endocrinology* 290(1-2): 44-50.

Bibliografía

- Mickley, K., Dluzen, DE. (2004). "Dose-response effects of estrogen and tamoxifen upon methamphetamine-induced behavioral responses and neurotoxicity of the nigrostriatal dopaminergic system in female mice." *Neuroendocrinology* 79(6): 305-316.
- Miller, D., Ali, SF., O'Callaghan, JP., Laws, SC. (1998). "The impact of gender and estrogen on striatal dopaminergic neurotoxicity." *Annals of the New York Academy of Sciences* 844(1): 153-165.
- Mineur, Y., Belzung, C., Crusio, WE. (2006). "Effects of unpredictable chronic mild stress on anxiety and depression-like behavior in mice." *Behavioural Brain Research* 175(1): 43-50.
- Mineur, Y., Belzung, C., Crusio, WE. (2007). "Functional implications of decreases in neurogenesis following chronic mild stress in mice." *Neuroscience* 150(2): 251-259.
- Mitschelen, M., Yan, H., Farley, JA., Warrington, JP., Han, S., Hereñú, CB., Csiszar, A., Ungvari, Z., Bailey-Downs, LC., Bass, CE., Sonntag, WE. (2011). "Long-term deficiency of circulating and hippocampal insulin-like growth factor I induces depressive behavior in adult mice: a potential model of geriatric depression." *Neuroscience* 185: 50-60.
- Mizoguchi, H., Takuma, K., Fukakusa, A., Ito, Y., Nakatani, A., Ibi, D., Kim, HC., Yamada, K. (2008). "Improvement by minocycline of methamphetamine-induced impairment of recognition memory in mice." *Psychopharmacology* 196(2): 233-241.
- Monleon, S., D'Aquila, P., Parra, A., Simon, VM., Brain, PF., Willner, P. (1995). "Attenuation of sucrose consumption in mice by chronic mild stress and its restoration by imipramine." *Psychopharmacology* 117(4): 453-457.
- Moon, R., Brown, JD., Torres, M. (1997). "WNTs modulate cell fate and behavior during vertebrate development." *Trends in Genetics* 13(4): 157-162.

Bibliografia

Moreau, J., Jenck, F., Martin, JR., Mortas, P., Haefely, WE. (1992). "Antidepressant treatment prevents chronic unpredictable mild stress-induced anhedonia as assessed by ventral tegmentum self-stimulation behavior in rats." *European Neuropsychopharmacology* 2(1): 43-49.

Morissette, M., Al Sweidi, S., Callier, S., Di Paolo, T. (2008b). "Estrogen and SERM neuroprotection in animal models of Parkinson's disease." *Molecular and Cellular Endocrinology* 290(1-2): 60-69.

Morissette, M., Le Saux, M., D'Astous, M., Jourdain, S., Al Sweidi, S., Morin, N., Estrada-Camarena, E., Mendez, P., Garcia-Segura, LM., Di Paolo, T. (2008a). "Contribution of estrogen receptors alpha and beta to the effects of estradiol in the brain." *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 108(3-5): 327-338.

Morley, J., Kaiser, F., Raum, WJ., Perry, HM., Flood, JF., Jensen, J., Silver, AJ., Roberts, E. (1997). "Potentially predictive and manipulable blood serum correlates of aging in the healthy human male: Progressive decreases in bioavailable testosterone, dehydroepiandrosterone sulfate, and the ratio of insulin-like growth factor 1 to growth hormone." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94(14): 7537-7542.

Mouri, A., Noda, Y., Enomoto, T., Nabeshima, T. (2007). "Phencyclidine animal models of schizophrenia: Approaches from abnormality of glutamatergic neurotransmission and neurodevelopment." *Neurochemistry International* 51(2-4): 173-184.

Mouri, A., Y. Noda, et al. (2007). "Phencyclidine animal models of schizophrenia: Approaches from abnormality of glutamatergic neurotransmission and neurodevelopment." *Neurochemistry International* 51(2-4): 173-184.

Mukai, K., Daifuku, K., Yokoyama, S., Nakano, M. (1990). "Stopped-flow investigation of antioxidant activity of estrogens in solution." *Biochimica et Biophysica Acta* 1035(3): 348-352.

Bibliografia

Müller, N. (2010). "COX-2 inhibitors as antidepressants and antipsychotics: clinical evidence." *Current Opinion in Investigational Drugs* 11(1): 31-42.

Müller, N., Empl, M., Riedel, M., Schwarz, M., Ackenheil, M. (1997). "Neuroleptic treatment increases soluble IL-2 receptors and decreases soluble IL-6 receptors in schizophrenia." *European Archives of Psychiatry and Clinical Neurosciences* 247(6): 308-313.

Murakoshi, M., Ikada, R., Tagawa, M. (1999). "Regulation of prostatic glutathione-peroxidase (GSH-PO) in rats treated with a combination of testosterone and 17 beta-estradiol." *Journal of Toxicological Sciences* 24(5): 415-420.

Naik, E., Dixit, VM. (2011). "Mitochondrial reactive oxygen species drive proinflammatory cytokine production." *The Journal of Experimental Medicine* 208(3): 417-20.

Nakano, M., Sugioka, K., Naito, I., Takekoshi, S., Niki, E. (1987). "Novel and potent biological antioxidants on membrane phospholipid peroxidation: 2-hydroxy estrone and 2-hydroxy estradiol." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 142(3): 919-24.

Nickelsen, T., Lufkin, EG., Riggs, BL., Cox, DA., Crook, TH. (1999). "Raloxifene hydrochloride, a selective estrogen receptor modulator: safety assessment of effects on cognitive function and mood in postmenopausal women." *Psychoneuroendocrinology* 24(1): 115-28.

Nilsen, J. (2008). "Estradiol and neurodegenerative oxidative stress." *Frontiers in Neuroendocrinology* 29(4): 463-475.

Nilsen, J., Brinton, RD. (2003a). "Divergent impact of progesterone and medroxyprogesterone acetate (Provera) on nuclear mitogen-activated protein kinase signaling." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100(18): 10506-10511.

Bibliografia

Nilsen, J., Brinton, RD. (2003b). "Mechanism of estrogen-mediated neuroprotection: Regulation of mitochondrial calcium and Bcl-2 expression." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100(5): 2842-2847.

Nilsen, J., Mor, G., Naftolin, F. (2000). "Estrogen-regulated developmental neuronal apoptosis is determined by estrogen receptor subtype and the Fas/Fas ligand system." *Journal of Neurobiology* 43(1): 64-78.

Núñez, J., Lauschke, DM., Juraska, JM. (2001). "Cell death in the development of the posterior cortex in male and female rats." *The Journal of Comparative Neurology* 436(1): 32-41.

O'Banion, M. (1999). "Cyclooxygenase-2: molecular biology, pharmacology, and neurobiology." *Critical Reviews in Neurobiology* 13(1): 45-82.

Ochedalski, T., Subburaju, S., Wynn, PC., Aguilera, G. (2007). "Interaction between oestrogen and oxytocin on hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity." *Journal of Neuroendocrinology* 19(3): 189-197.

Olney, J., Farber, NB. (1995). "Glutamate receptor dysfunction and schizophrenia." *Archives of General Psychiatry* 52(12): 998-1007.

Onder, G., Pellicciotti, F., Gambassi, G., Bernabei, R. (2004). "NSAID-related psychiatric adverse events: who is at risk?" *Drugs* 64(23): 2619-2627.

O'Neill, K., Chen, S., Brinton, R.D., (2004). "Impact of the selective estrogen receptor modulator, tamoxifen, on neuronal outgrowth and survival following toxic insults associated with aging and Alzheimer's disease." *Experimental Neurology* 188(2): 268-278.

Orikasa, C., McEwen, BS., Hayashi, H., Sakuma, Y., Hayashi, S. (2000). "Estrogen receptor alpha, but not beta, is expressed in the interneurons of the hippocampus in

Bibliografia

prepubertal rats: an in situ hybridization study." *Developmental Brain Research* 120(2): 245-254.

Ortolani, D., Oyama, LM., Ferrari, EM., Melo, LL., Spadari-Bratfisch, RC. (2011). "Effects of comfort food on food intake, anxiety-like behavior and the stress response in rats." *Physiology & Behavior* 103(5): 487-492.

Ospina, J., Brevig, HN., Krause, DN., Duckles, SP. (2004). "Estrogen suppresses IL-1 β -mediated induction of COX-2 pathway in rat cerebral blood vessels." *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 286(5): H2010-H2019.

Ozawa, K., Hashimoto, K., Kishimoto, T., Shimizu, E., Ishikura, H., Iyo, M. (2006). "Immune activation during pregnancy in mice leads to dopaminergic hyperfunction and cognitive impairment in the offspring: a neurodevelopmental animal model of schizophrenia." *Biological Psychiatry* 59(6): 546-554.

Paintlia, M., Paintlia, AS., Barbosa, E., Singh, I., Singh, AK. (2004). "N-acetylcysteine prevents endotoxin-induced degeneration of oligodendrocyte progenitors and hypomyelination in developing rat brain." *Journal of Neuroscience Research* 78(3): 347-361.

Papalexi, E., Antoniou, K., Kitraki, E. (2005). "Estrogens influence behavioral responses in a kainic acid model of neurotoxicity." *Hormones and Behavior* 48(3): 291-302.

Park, S., Dantzer, R., Kelley, KW., McCusker, RH. (2011). "Central administration of insulin-like growth factor-I decreases depressive-like behavior and brain cytokine expression in mice." *Journal of Neuroinflammation* 9: 8-12.

Paul, S., Purdy, RH (1992). "Neuroactive steroids." *The FASEB Journal* 6(6): 2311-2322.

Bibliografia

Pawluski, J., Brummelte, S., Barha, CK., Crozier, TM., Galea, LA. (2009). "Effects of steroid hormones on neurogenesis in the hippocampus of the adult female rodent during the estrous cycle, pregnancy, lactation and aging." *Frontiers in Neuroendocrinology* 30(3): 343-357.

Pecoraro, N., Reyes, F., Gomez, F., Bhargava, A., Dallman, MF. (2004). "Chronic stress promotes palatable feeding, which reduces signs of stress: feedforward and feedback effects of chronic stress." *Endocrinology* 145(8): 3754-3762.

Pellow, S., Chopin, P., File, SE., Briley, M. (1985). "Validation of open : closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat." *Journal of Neuroscience Methods* 14(3): 149-167.

Peluso, J., Pappalardo, A., Losel, R., Wehling, M. (2006). "Progesterone membrane receptor component 1 expression in the immature rat ovary and its role in mediating progesterone's antiapoptotic action." *Endocrinology* 147(6): 3133-3140

Pereira, M., Martynhak, BJ., Baretta, IP., Correia, D., Siba, IP., Andreatini, R. (2011). "Antimanic-like effect of tamoxifen is not reproduced by acute or chronic administration of medroxyprogesterone or clomiphene." *Neuroscience Letters* 500(2): 95-98.

Perez-Martin, M., Azcoitia, I., Trejo, JL., Sierra, A., Garcia-Segura, LM (2003). "An antagonist of estrogen receptors blocks the induction of adult neurogenesis by insulin-like growth factor-I in the dentate gyrus of adult female rat". *The European Journal of Neuroscience* 18(4): 923-930.

Petitclerc, M., Bédard, PJ., Di Paolo, T. (1995). "Progesterone releases dopamine in male and female rat striatum: a behavioral and microdialysis study." *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 19(3): 491-497.

Picazo, O., Azcoitia, I., Garcia-Segura, LM (2003). "Neuroprotective and neurotoxic effects of estrogens." *Brain Research* 990(1-2): 20-27.

Bibliografia

- Pike, C. (1999). "Estrogen Modulates Neuronal Bcl-xl Expression and β -Amyloid-Induced Apoptosis." *Journal of Neurochemistry* 72(4): 1552-1563.
- Pillay, V., Savage, N., Laburn, H. (1993). "Interleukin-1 receptor antagonist in newborn babies and pregnant women." *Pflugers Archiv: European journal of physiology* 424 (5-6): 549-551.
- Pitsikas, N., Tsitsirigou, S., Zisopoulou, S., Sakellaridis, N. (2005). "The 5-HT1A receptor and recognition memory: possible modulation of its behavioral effects by the nitergic system." *Behavioural Brain Research* 159(2): 287-293.
- Polan, M., Daniele, A., Kuo, A. (1988). "Gonadal steroids modulate human monocyte interleukin-1 (IL-1) activity." *Fertility and Sterility* 49(6): 964-968.
- Polan, M., Loukides, J., Nelson, P., Carding, S., Diamond, M., Walsh, A., Bottomly, K. (1989). "Progesterone and estradiol modulate interleukin-1 β messenger ribonucleic acid levels in cultured human peripheral monocytes." *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 69(6): 1200-1206.
- Porrino, L., Lucignani, G., Dow-Edwards, D., Sokoloff, Louis. (1984). "Correlation of dose-dependent effects of acute amphetamine administration on behavior and local cerebral metabolism in rats." *Brain Research* 307(1-2): 311-320.
- Porsolt, R. D., A. Bertin, et al. (1979). "Immobility induced by forced swimming in rats: Effects of agents which modify central catecholamine and serotonin activity." *European Journal of Pharmacology* 57(2-3): 201-210.
- Pothion, S., Bizot, J.C., Trovero, F., Belzung, C. (2004). "Strain differences in sucrose preference and in the consequences of unpredictable chronic mild stress." *Behavioural Brain Research* 155(1): 135-146.

Bibliografia

Pozzi, S., Benedusi, V., Maggi, A., Vegeto, E. (2006). "Estrogen action in neuroprotection and brain inflammation." *Annals of the New York Academy of Sciences* 1089(1): 302-323.

Purdie, D., Beardsworth, SA. (1999). "The selective oestrogen receptor modulation: evolution and clinical applications." *British Journal of Clinical Pharmacology* 48(6): 785-792.

Pycock, C., Kerwin, RW., Carter, CJ. (1980). "Effect of lesion of cortical dopamine terminals on subcortical dopamine receptors in rats." *Nature* 286 (5768): 74-76.

Quesada, A., Romeo, HE., Micevych, P. (2007). "Distribution and localization patterns of estrogen receptor- β and insulin-like growth factor-1 receptors in neurons and glial cells of the female rat substantia nigra: Localization of ER β and IGF-1R in substantia nigra." *The Journal of Comparative Neurology* 503(1): 198-208.

Quinn, N., Marsden, CD. (1986). "Menstrual-related fluctuations in Parkinson's disease." *Movement disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society* 1(1): 85-87.

Rachman, I., Unnerstall, JR., Pfaff, DW., Cohen, RS. (1998). "Estrogen alters behavior and forebrain c-fos expression in ovariectomized rats subjected to the forced swim test." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(23): 13941-13946.

Rajput, A., Offord, KP., Beard, CM., Kurland, LT. (1984). "Epidemiology of parkinsonism: incidence, classification, and mortality." *Annals of Neurology* 16(3): 278-282.

Ramirez, A., Liu, X., Menniti, FS. (2003). "Repeated estradiol treatment prevents MPTP-induced dopamine depletion in male mice." *Neuroendocrinology* 77(4): 223-231.

Bibliografia

- Razandi, M., Pedram, A., Greene, GL., Levin, ER. (1999). "Cell membrane and nuclear estrogen receptors (ERs) originate from a single transcript: studies of ER alpha and ER beta expressed in Chinese hamster ovary cells." *Molecular Endocrinology* 13(2): 307-319.
- Rees, G., Ball, C., Ward, HL.,Gee, CK.,Tarrant, G.,Mistry, Y.,Poole, S.,Bristow, AF. (1999). "Rat interleukin 6: expression in recombinant Escherichia Coli, purification and development of a novel ELISA " *Cytokine* 11(2): 95-103.
- Regan, R., Guo, Y. (1997). "Estrogens attenuate neuronal injury due to hemoglobin, chemical hypoxia, and excitatory amino acids in murine cortical cultures." *Brain Research* 764(1-2): 133-140.
- Reynolds, R., Dawson, M.,Papadopoulos, D.,Polito, A.,di Bello, IC.,Pham-Dinh, D.,Levine, J. (2002). "The response of NG2-expressing oligodendrocyte progenitors to demyelination in MOG-EAE and MS." *Journal of Neurocytology* 31(6): 523-536.
- Rhodes, M., Frye, CA. (2006). "ER beta selective SERMs produce mnemonic-enhancing effects in the inhibitory avoidance and water maze tasks." *Neurobiology of Learning and Memory* 85(2): 183-191.
- Rivest, S., Laflamme, N., Nappi, RE (1995). "Immune challenge and immobilization stress induce transcription of the gene encoding the CRF receptor in selective nuclei of the rat hypothalamus." *The Journal of Neuroscience* 15(4): 2680-2695.
- Robinson, G., Stewart, DE. (1986). "Postpartum psychiatric disorders." *Canadian Medical Association Journal* 134(1): 31-37.
- Rocha, B., Fleischer, R., Schaeffer, JM.,Rohrer, SP.,Hickey, GJ. (2005). "17 β -estradiol-induced antidepressant-like effect in the forced swim test is absent in estrogen receptor- β knockout (BERKO) mice." *Psychopharmacology* 179(3): 637-643.

Bibliografia

Rodriguez-Sierra, J., Howard, J.L., Pollard, G.T., Hendricks, S.E. (1984). "Effect of ovarian hormones in conflict behaviour." *Psychoneuroendocrinology* 9(3): 293-300.

Romero, E., Ali, C., Molina-Holgado, E., Castellano, B., Guaza, C., Borrell, J. (2007). "Neurobehavioral and immunological consequences of prenatal immune activation in rats. influence of antipsychotics." *Neuropsychopharmacology* 32(8): 1791-1804.

Rossi, S., De Chiara, V., Musella, A., Kusayanagi, H., Mataluni, G., Bernardi, G., Usiello, A., Centonze, D. (2008). "Chronic psychoemotional stress impairs cannabinoid-receptor-mediated control of GABA transmission in the striatum." *The Journal of Neuroscience* 28(29): 7284-7292.

Rossouw, J., Anderson, G.L., Prentice, R.L., LaCroix, A.Z., Kooperberg, C., Stefanick, M.L., Jackson, R.D., Beresford, S.A., Howard, B.V., Johnson, K.C., Kotchen, J.M., Ockene, J.; Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators. (2002). "Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women." *JAMA: The Journal of the American Medical Association* 288(3): 321-333.

Roumier, A., Pascual, O., Béchade, C., Wakselman, S., Poncer, J.C., Réal, E., Triller, A., Bessis, A. (2008). "Prenatal activation of microglia induces delayed impairment of glutamatergic synaptic function." *PLoS One* 3(7): e2595.

Routley, C., Ashcroft, G.S. (2009). "Effect of estrogen and progesterone on macrophage activation during wound healing." *Wound Repair and Regeneration* 17(1): 42-50.

Rupprecht, R. (2003). "Neuroactive steroids: mechanisms of action and neuropsychopharmacological properties." *Psychoneuroendocrinology* 28(2): 139-168.

Rupprecht, R., Koch, M., Montkowski, A., Lancel, M., Faulhaber, J., Harting, J., Spanagel, R. (1999). "Assessment of neuroleptic-like properties of progesterone." *Psychopharmacology* 143(1): 29-38.

Bibliografia

- Rygula, R., Abumaria, N., Flügge, G., Fuchs, E., Rütger, E., Havemann-Reinecke, U. (2005). "Anhedonia and motivational deficits in rats: Impact of chronic social stress." *Behavioural Brain Research* 162(1): 127-134.
- Saito, Y., Vandenheede, JR., Cohen, P. (1994). "The mechanism by which epidermal growth factor inhibits glycogen synthase kinase 3 in A431 cells." *The Biochemical Journal* 303(Pt 1): 27-31.
- Salem, J., Kring, AM. (1998). "The role of gender differences in the reduction of etiologic heterogeneity in schizophrenia." *Clinical Psychology Review* 18(7): 795-819.
- Santarelli, L., Saxe, M., Gross, C., Surget, A., Battaglia, F., Dulawa, S., Weisstaub, N., Lee, J., Duman, R., Arancio, O., Belzung, C., Hen, R. (2003). "Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants." *Science* 301(5634): 805-809.
- Saunders-Pullman, R. (2003). "Estrogens and parkinson disease." *Endocrine* 21(1): 81-87.
- Saunders-Pullman, R., Gordon-Elliott, J., Parides, M., Fahn, S., Saunders, HR., Bressman, S. (1999). "The effect of estrogen replacement on early Parkinson's disease." *Neurology* 52(7): 1417-1421.
- Scarpin, K., Graham, JD., Mote, PA., Clarke, CL. (2009). "Progesterone action in human tissues: regulation by progesterone receptor (PR) isoform expression, nuclear positioning and coregulator expression." *Nuclear Receptor Signalling* 7: e009.
- Schmidt, P., Haq, N., Rubinow, DR. (2004). "A longitudinal evaluation of the relationship between reproductive status and mood in perimenopausal women." *The American Journal of Psychiatry* 161(12): 2238-2244.

Bibliografia

Schmitz, C., Rhodes, ME., Bludau, M., Kaplan, S., Ong, P., Ueffing, I., Vehoff, J., Korr, H., Frye, CA. (2002). "Depression: reduced number of granule cells in the hippocampus of female, but not male, rats due to prenatal restraint stress." *Molecular Psychiatry* 7(7): 810-813.

Schwartz, R. (1988). "The GABA_A receptor-gated ion channel: Biochemical and pharmacological studies of structure and function." *Biochemical Pharmacology* 37(18): 3369-3375.

Schwarz, J., McCarthy, MM. (2008). "Cellular mechanisms of estradiol-mediated masculinization of the brain." *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 109(3-5): 300-306.

Seale, J., Wood, SA., Atkinson, HC., Harbuz, MS., Lightman, SL. (2004). "Gonadal steroid replacement reverses gonadectomy-induced changes in the corticosterone pulse profile and stress-induced hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity of male and female rats." *Journal of Neuroendocrinology* 16(12): 989-998.

Seeman, M. (1996). "The role of estrogen in schizophrenia." *Journal of Psychiatry and Neuroscience: JPN* 21(2):123-127.

Sekiguchi, H., Iritani, S., Habuchi, C., Torii, Y., Kuroda, K., Kaibuchi, K., Ozaki, N. (2011). "Impairment of the tyrosine hydroxylase neuronal network in the orbitofrontal cortex of a genetically modified mouse model of schizophrenia." *Brain Research* 1392: 47-53.

Shang, Y., Hu, X., DiRenzo, J., Lazar, MA., Brown, M. (2000). "Cofactor dynamics and sufficiency in estrogen receptor regulated transcription." *Cell* 103(6): 843-852.

Sharp, T., Cowen, PJ. (2011). "5-HT and depression: is the glass half-full?" *Current Opinion in Pharmacology* 11(1): 45-51.

Bibliografia

Shi, L., Smith, SE., Malkova, N., Tse, D., Su, Y., Patterson, PH. (2009). "Activation of the maternal immune system alters cerebellar development in the offspring." *Brain, Behavior, and Immunity* 23(1): 116-123.

Shors, T., Mathew, J., Sisti, HM., Edgecomb, C., Beckoff, S., Dalla, C. (2007). "Neurogenesis and helplessness are mediated by controllability in males but not in females." *Biological Psychiatry* 62(5): 487-495.

Singer, C., Rogers, KL., Strickland, TM., Dorsa, DM. (1996). "Estrogen protects primary cortical neurons from glutamate toxicity." *Neuroscience Letters* 212(1): 13-16.

Śluzewska, A., Rybakowski, JK., Laciak, M., Mackiewicz, A., Sobieska, M., Wiktorowicz, K. (1995). "Interleukin-6 serum levels in depressed patients before and after treatment with fluoxetine." *Annals of the New York Academy of Sciences* 762(1): 474-476.

Song, C., Lin, A., Kenis, G., Bosmans, E., Maes, M. (2000). "Immunosuppressive effects of clozapine and haloperidol: enhanced production of the interleukin-1 receptor antagonist." *Schizophrenia Research* 42(2): 157-164.

Spritzer, M., Gill, M., Weinberg, A., Galea, LA. (2008). "castration differentially affects spatial working and reference memory in male rats." *Archives of Sexual Behavior* 37(1): 19-29.

Sribnick, E., Ray, SK., Nowak, MW., Li, L., Banik, NL. (2004). "17 β -estradiol attenuates glutamate-induced apoptosis and preserves electrophysiologic function in primary cortical neurons." *Journal of Neuroscience Research* 76(5): 688-696.

Stallcup, W., Beasley, L. (1987). "Bipotent glial precursor cells of the optic nerve express the NG2 proteoglycan." *The Journal of Neuroscience* 7(9): 2737-2744.

Bibliografia

Stone, D., Song, Y., Anderson, CP., Krohn, KK., Finch, CE., Rozovsky, I. (1998). "Bidirectional transcription regulation of glial fibrillary acidic protein by estradiol in vivo and in vitro." *Endocrinology* 139(7): 3202-3209.

Strickler, R., Stovall, DW., Merritt, D., Shen, W., Wong, M., Silfen, SL. (2000). "Raloxifene and estrogen effects on quality of life in healthy postmenopausal women: a placebo-controlled randomized trial." *Obstetrics and Gynecology*. 96 (3): 359-365.

Sugino, H., Futamura, T., Mitsumoto, Y., Maeda, K., Marunaka, Y. (2009). "Atypical antipsychotics suppress production of proinflammatory cytokines and up-regulate interleukin-10 in lipopolysaccharide-treated mice." *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 33(2): 303-307.

Surget, A., Saxe, M., Leman, S., Ibarguen-Vargas, Y., Chalon, S., Griebel, G., Hen, R., Belzung, C. (2008). "Drug-dependent requirement of hippocampal neurogenesis in a model of depression and of antidepressant reversal." *Biological Psychiatry* 64(4): 293-301.

Surmeli, M., Habesoglu, TE., Habesoglu, M., Deveci, I., Eriman, M., Kinis, V., Gunes, P., Egeli, E. (2011). "Histopathological effects of estrogen deficiency on larynx mucosa in ovariectomised rats." *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology* 268(2): 261-266.

Sutcliffe, J., Marshall, KM., Neill, JC. (2007). "Influence of gender on working and spatial memory in the novel object recognition task in the rat." *Behavioural Brain Research* 177(1): 117-125.

Sutherland, C., Leighton, IA., Cohen, P. (1993). "Inactivation of glycogen synthase kinase-3 beta by phosphorylation: new kinase connections in insulin and growth-factor signalling." *The Biochemical Journal* 296 (Pt 1): 15-19.

Swaab, D., Bao, AM., Lucassen, PJ. (2005). "The stress system in the human brain in depression and neurodegeneration." *Ageing Research Reviews* 4(2): 141-194.

Bibliográfia

Szelényi, J. (2001). "Cytokines and the central nervous system." *Brain Research Bulletin* 54(4): 329-338.

Tanapat, P., Hastings, NB., Gould, E. (2005). "Ovarian steroids influence cell proliferation in the dentate gyrus of the adult female rat in a dose- and time-dependent manner." *The Journal of Comparative Neurology* 481(3): 252-265.

Tanapat, P., Hastings, NB., Reeves, AJ., Gould, E. (1999). "Estrogen stimulates a transient increase in the number of new neurons in the dentate gyrus of the adult female rat." *The Journal of Neuroscience* 19(14): 5792-5801.

Tapia-Gonzalez, S., Carrero, P., Pernia, O., Garcia-Segura, L.M., Diz-Chaves, Y., (2008). "Selective oestrogen receptor (ER) modulators reduce microglia reactivity in vivo after peripheral inflammation: potential role of microglial ERs." *The Journal of Endocrinology* 198(1): 219-230.

Tata, J. (2002). "Signalling through nuclear receptors." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 3(9): 702-710.

Tee, M., Rogatsky, I., Tzagarakis-Foster, C., Cvaro, A., An, J., Christy, RJ., Yamamoto, KR., Leitman, DC. (2004). "Estradiol and selective estrogen receptor modulators differentially regulate target genes with estrogen receptors alpha and beta." *Molecular Biology of the Cell* 15(3): 1262-1272.

Thompson, D., Spanier, CA., Vogel, VG., (1999). "The relationship between tamoxifen, estrogen, and depressive symptoms." *The Breast Journal* 5(6): 375-382.

Thorne, M. R., George S. (2007). "Cognitive impairments in the STOP null mouse model of schizophrenia." *Behavioural Neuroscience* 121(5): 826-835.

Bibliografia

Todd, B., Fraley, GS., Peck, AC., Schwartz, GJ., Etgen, AM. (2007). "Central insulin-like growth factor 1 receptors play distinct roles in the control of reproduction, food intake, and body weight in female rats." *Biology of Reproduction* 77(3): 492-503.

Toran-Allerand, C., Guan, X., MacLusky, NJ., Horvath, TL., Diano, S., Singh, M., Connolly, ES. Jr., Nethrapalli, IS., Tinnikov, AA. (2002). "ER-X: A novel, plasma membrane-associated, putative estrogen receptor that is regulated during development and after ischemic brain injury." *The Journal of Neuroscience* 22(19): 8391-8401.

Tynan, R., Naicker, S., Hinwood, M., Nalivaiko, E., Buller, KM., Pow, DV., Day, TA., Walker, FR. (2010). "Chronic stress alters the density and morphology of microglia in a subset of stress-responsive brain regions." *Brain, Behavior, and Immunity* 24(7): 1058-1068.

Ulrich-Lai, Y., Christiansen, AM., Ostrander, MM., Jones, AA., Jones, KR., Choi, DC., Krause, EG., Evanson, NK., Furay, AR., Davis, JF., Solomon, MB., de Kloet, AD., Tamashiro, KL., Sakai, RR., Seeley, RJ., Woods, SC., Herman, JP. (2010). "Pleasurable behaviors reduce stress via brain reward pathways." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107(47): 20529-20534.

Ulrich-Lai, Y., Ostrander, MM., Herman, JP. (2011). "HPA axis dampening by limited sucrose intake: Reward frequency vs. caloric consumption." *Physiology & Behavior* 103(1): 104-110.

Urakubo, A., Jarskog, LF., Lieberman, JA., Gilmore, JH. (2001). "Prenatal exposure to maternal infection alters cytokine expression in the placenta, amniotic fluid, and fetal brain." *Schizophrenia Research* 47(1): 27-36.

Vaillancourt, C., Cyr, M., Rochford, J., Boksa, P., Di Paolo, T. (2002). "Effects of ovariectomy and estradiol on acoustic startle responses in rats." *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 74(1): 103-109.

Bibliografia

Van den Buuse, M., Eikelis, N. (2001). "Estrogen increases prepulse inhibition of acoustic startle in rats." *European Journal of Pharmacology* 425(1): 33-41.

Vane, J., Mitchell, J.A., Appleton, I., Tomlinson, A., Bishop-Bailey, D., Croxtall, J., Willoughby, D.A. (1994). "Inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric-oxide synthase in inflammation." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91(6): 2046-2050.

Vaucher, E., Reymond, I., Najaffe, R., Kar, S., Quirion, R., Miller, M.M., Franklin, K.B. (2002). "Estrogen effects on object memory and cholinergic receptors in young and old female mice." *Neurobiology of Aging* 23(1): 87-95.

Vegeto, E., Belcredito, S., Etteri, S., Ghisletti, S., Brusadelli, A., Meda, C., Krust, A., Dupont, S., Ciana, P., Chambon, P., Maggi, A. (2003). "Estrogen receptor- α mediates the brain antiinflammatory activity of estradiol." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100(16): 9614-9619.

Vegeto, E., Bonincontro, C., Pollio, G., Sala, A., Viappiani, S., Nardi, F., Brusadelli, A., Viviani, B., Ciana, P., Maggi, A. (2001). "Estrogen prevents the lipopolysaccharide-induced inflammatory response in microglia." *The Journal of Neuroscience* 21(6): 1809-1818.

Venkatasubramanian, G., Chittiprol, S., Neelakantachar, N., Shetty, T., Gangadhar, B.N. (2010). "Effect of antipsychotic treatment on Insulin-like Growth Factor-1 and cortisol in schizophrenia: a longitudinal study." *Schizophrenia Research* 119(1): 131-137.

Venkatasubramanian, G., Chittiprol, S., Neelakantachar, N., Naveen, M.N., Thirthall, J., Gangadhar, B.N., Shetty, K.T. (2007). "Insulin and insulin-like growth factor-1 abnormalities in antipsychotic-naive schizophrenia." 164: 1557-1560.

Vigano, D., Guidali, C., Petrosino, S., Realini, N., Rubino, T., Di Marzo, V., Parolaro, D. (2009). "Involvement of the endocannabinoid system in phencyclidine-induced cognitive

Bibliografia

deficits modelling schizophrenia." *The International Journal of Neuropsychopharmacology* 12(5): 599-614.

Vogelvang, T., van der Mooren, MJ., Mijatovic, V., Kenemans, P. (2006). "Emerging selective estrogen receptor modulators: special focus on effects on coronary heart disease in postmenopausal women." *Drugs* 66(2): 191-221.

Wade, G. (1975). "Some effects of ovarian hormones on food intake and body weight in female rats." *Journal of Comparative and Physiological Psychology* 88(1): 183-193.

Wade, G., Gray, JM., Bartness, TJ. (1985). "Gonadal influences on adiposity." *International Journal of Obesity* 9 Suppl 1: 83-92.

Wagner, G., Tekirian, TL., Cheo, CT. (1993). "Sexual differences in sensitivity to methamphetamine toxicity." *Journal of Neural Transmission. General section* 93(1): 67-70.

Walf, AA., Frye, CA. (2005a). "Antianxiety and antidepressive behavior produced by physiological estradiol regimen may be modulated by hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity." *Neuropsychopharmacology* 30(7): 1288-1301.

Walf, AA., Frye, CA. (2005b). "ERbeta-selective estrogen receptor modulators produce antianxiety behavior when administered systemically to ovariectomized rats." *Neuropsychopharmacology* 30(9): 1598-1609.

Walf, AA., Frye, CA. (2006). "A review and update of mechanisms of estrogen in the hippocampus and amygdala for anxiety and depression behavior." *Neuropsychopharmacology* 31(6): 1097-1111.

Walf, AA., Frye, CA. (2007). "Administration of estrogen receptor beta-specific selective estrogen receptor modulators to the hippocampus decrease anxiety and depressive behavior of ovariectomized rats." *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 86(2): 407-414.

Bibliografia

Walf, AA., Frye, CA. (2009). "Effects of two estradiol regimens on anxiety and depressive behaviors and trophic effects in peripheral tissues in a rodent model." *Gender Medicine* 6(1): 300-311.

Walf, AA., Frye, CA. (2010a). "Estradiol reduces anxiety- and depression-like behavior of aged female mice." *Physiology & Behavior* 99(2): 169-174.

Walf, AA., Frye, CA. (2010b). "Raloxifene and/or estradiol decrease anxiety-like and depressive-like behavior, whereas only estradiol increases carcinogen-induced tumorigenesis and uterine proliferation among ovariectomized rats." *Behavioural Pharmacology* 21(3): 231-240

Walf, AA., Rhodes, ME., Frye, CA. (2004). "Antidepressant effects of ERbeta-selective estrogen receptor modulators in the forced swim test." *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 78(3): 523-529.

Walf, AA., Rhodes, ME., Frye, CA. (2006). "Ovarian steroids enhance object recognition in naturally cycling and ovariectomized, hormone-primed rats." *Neurobiology of Learning and Memory* 86(1): 35-46.

Wallace, M., Luine, V., Arellanos, A., Frankfurt, M. (2006). "Ovariectomized rats show decreased recognition memory and spine density in the hippocampus and prefrontal cortex." *Brain Research* 1126(1): 176-182.

Wang, Q., Santizo, R., Baughman, VL., Pelligrino, DA., Iadecola, C. (1999). "Estrogen provides neuroprotection in transient forebrain ischemia through perfusion-independent mechanisms in rats " *Stroke* 30(3): 630-637.

Wassink, T., Andreasen, NC., Nopoulos, P., Flaum, M. (1999). "Cerebellar morphology as a predictor of symptom and psychosocial outcome in schizophrenia." *Biological Psychiatry* 45(1): 41-48.

Bibliografia

Watanabe, M., Toyama, Y., Nishiyama, A. (2002). "Differentiation of proliferated NG2-positive glial progenitor cells in a remyelinating lesion." *Journal of Neuroscience Research* 69(6): 826-836.

Weiland, N., Orikasa, C., Hayashi, S., McEwen, BS. (1997). "Distribution and hormone regulation of estrogen receptor immunoreactive cells in the hippocampus of male and female rats." *The Journal of Comparative Neurology* 388(4): 603-612.

Weinberger, D. (1987). "Implications of normal brain development for the pathogenesis of schizophrenia." *Archives of General Psychiatry* 44(7): 660-669.

Weissman, M., Bland, R., Joyce, PR., Newman, S., Wells, JE., Wittchen, HU. (1993). "Sex differences in rates of depression: cross-national perspectives." *Journal of Affective Disorders* 29(2-3): 77-84.

Weissman, M., Klerman, GL. (1977). "Sex differences and the epidemiology of depression." *Archives of General Psychiatry* 34(1): 98-111.

Wen, Y., Yang, S., Liu, R., Perez, E., Yi, KD., Koulen, P., Simpkins, JW. (2004). "Estrogen attenuates nuclear factor-kappa B activation induced by transient cerebral ischemia." *Brain Research* 1008(2): 147-154.

West, M., Heagy, W. (2002). "Endotoxin tolerance: a review." *Critical Care Medicine* 30(1): S64-S73.

Westenbroek, C., Den Boer, JA., Veenhuis, M., Ter Horst, GJ. (2004). "Chronic stress and social housing differentially affect neurogenesis in male and female rats." *Brain Research Bulletin* 64(4): 303-308.

Willner, P. (1997). "Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation." *Psychopharmacology* 134(4): 319-329.

Bibliografia

Willner, P., Towell, A., Sampson, D., Sophokleous, S., Muscat, R. (1987). "Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant." *Psychopharmacology* 93(3): 358-364.

Winter, C., Djodari-Irani, A., Sohr, R., Morgenstern, R., Feldon, J., Juckel, G., Meyer, U. (2009). "Prenatal immune activation leads to multiple changes in basal neurotransmitter levels in the adult brain: implications for brain disorders of neurodevelopmental origin such as schizophrenia" *Cambridge Journals Online*. 12: 513-524.

Wittchen, H., Hoyer, J. (2001). "Generalized anxiety disorder: nature and course." *Journal of Clinical Psychiatry* 62 Suppl (11): 15-19.

Wolff, A., Bilkey, DK. (2008). "Immune activation during mid-gestation disrupts sensorimotor gating in rat offspring." *Behavioural Brain Research* 190(1): 156-159.

Wood, S., Yücel, M., Pantelis, C., Berk, M. (2009). "Neurobiology of schizophrenia spectrum disorders: the role of oxidative stress." *Annals of the Academy of Medicine, Singapore* 38(5): 396-396.

Wright, C., Schwarz, JS., Dean, SL., McCarthy, MM. (2010). "Cellular mechanisms of estradiol-mediated sexual differentiation of the brain." *Trends in Endocrinology & Metabolism* 21(9): 553-561.

Wright, C., Schwarz, JS., Dean, SL., McCarthy, MM. (2010). "Cellular mechanisms of estradiol-mediated sexual differentiation of the brain." *Trends in Endocrinology & Metabolism* 21(9): 553-561.

Yaffe, K., Krueger, K., Cummings, SR., Blackwell, T., Henderson, VW., Sarkar, S., Ensrud, K., Grady, D. (2005). "Effect of raloxifene on prevention of dementia and cognitive impairment in older women: the multiple outcomes of raloxifene evaluation (MORE) randomized trial." *The American Journal of Psychiatry* 162(4): 683-690.

Bibliografía

Yamagata, K., Andreasson, KI., Kaufmann, WE., Barnes, CA., Worley, PF. (1993). "Expression of a mitogen-inducible cyclooxygenase in brain neurons: regulation by synaptic activity and glucocorticoids." *Neuron* 11(2): 371-386.

Yates, M., Juraska, JM. (2008). "Pubertal ovarian hormone exposure reduces the number of myelinated axons in the splenium of the rat corpus callosum." *Experimental Neurology* 209(1): 284-287.

Yetnikoff, L., Labelle-Dumais, C., Flores, C. (2007). "Regulation of netrin-1 receptors by amphetamine in the adult brain." *Neuroscience* 150(4): 764-773.

Yue, X., Lu, M., Lancaster, T., Cao, P., Honda, S., Staufenbiel, M., Harada, N., Zhong, Z., Shen, Y., Li, R. (2005). "Brain estrogen deficiency accelerates A β plaque formation in an Alzheimer's disease animal model." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(52): 19198-19203.

Yui, K., Goto, K., Ikemoto, S., Ishiguro, T., Angrist, B., Duncan, GE., Sheitman, BB., Lieberman, JA., Bracha, SH., Ali, SF. (1999). "Neurobiological basis of relapse prediction in stimulant-induced psychosis and schizophrenia: the role of sensitization." *Molecular Psychiatry* 4(6): 512-523.

Zarate, C. J., Singh, JB., Carlson, PJ., Quiroz, J., Jolkovsky, L., Luckenbaugh, DA., Manji, HK. (2007). "Efficacy of a protein kinase C inhibitor (tamoxifen) in the treatment of acute mania: a pilot study." *Bipolar Disorders* 9(6): 561-570.

Zaulyanov, L., Green, PS., Simpkins, JW. (1999). "Glutamate receptor requirement for neuronal death from anoxia-reoxygenation: an in vitro model for assessment of the neuroprotective effects of estrogens." *Cellular and Molecular Neurobiology* 19(6): 705-718.

Zender, R., Olshansky, E. (2009). "Women's mental health: depression and anxiety." *The Nursing Clinics of North America* 44(3): 355-364.

Bibliografía

Zhang, C., Li, XY., Zhao, L., Wang, H., Xu, DX. (2007). "Lipopolysaccharide (LPS) up-regulates the expression of haem oxygenase-1 in mouse placenta." *Placenta* 28(8): 951-957.

Zhao, L., Chen, S., Ming Wang, J., Brinton, RD. (2005). "17[beta]-estradiol induces Ca^{2+} influx, dendritic and nuclear Ca^{2+} rise and subsequent cyclic AMP response element-binding protein activation in hippocampal neurons: A potential initiation mechanism for estrogen neurotrophism." *Neuroscience* 132(2): 299-311.

Zukov, I., Ptáček, R., Raboch, J., Domluvilová, D., Kuzelová, H., Fischer, S., Kozelek, P. (2010). "Premenstrual dysphoric disorder--review of actual findings about mental disorders related to menstrual cycle and possibilities of their therapy." *Prague Medical Report* 111(1): 12-24.